



Rôle de l'autoréactivité sur les capacités suppressives des lymphocytes T régulateurs CD4+ Foxp3+

Arnaud Delpoux

► To cite this version:

Arnaud Delpoux. Rôle de l'autoréactivité sur les capacités suppressives des lymphocytes T régulateurs CD4+ Foxp3+. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T052 . tel-00931647

HAL Id: tel-00931647

<https://theses.hal.science/tel-00931647>

Submitted on 15 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

ÉCOLE DOCTORALE GC2iD

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Immunologie

Présentée par

Arnaud DELPOUX

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université Paris Descartes

<p>Rôle de l'autoréactivité sur les capacités suppressives des lymphocytes T régulateurs CD4⁺ Foxp3⁺</p>

Soutenue le 29 Novembre 2013 en présence du jury composé de :

Madame le Professeur Geneviève de SAINT-BASILE

Présidente

Madame le Docteur Christine BOURGEOIS

Rapporteur

Monsieur le Docteur Benoît SALOMON

Rapporteur

Monsieur le Docteur David GROSS

Examineur

Monsieur le Docteur Yassine TAOUFIK

Examineur

Monsieur le Docteur Bruno LUCAS

Directeur de thèse

RÉSUMÉ

La plupart des lymphocytes T régulateurs $CD4^+$ $Foxp3^+$ (Tregs) sont générés dans le thymus. Plusieurs études suggèrent fortement que le développement des Tregs est dû à la forte affinité de leur TCR pour le soi (complexes « peptide du soi-CMH II ») présenté dans le thymus. Après avoir migré à la périphérie, les Tregs continuent d'interagir avec le soi et l'expression de $Foxp3$ est considérée comme nécessaire et suffisante pour maintenir le programme de transcription nécessaire aux fonctions suppressives de ces cellules en périphérie.

En utilisant deux modèles expérimentaux chez la souris, notre étude démontre l'importance des interactions continues avec le soi pour maintenir les capacités suppressives des Tregs à la périphérie. L'absence d'interactions avec le soi aboutit rapidement à une altération du phénotype des Tregs, de leur capacité à produire certaines cytokines et modifie également leur signature transcriptionnelle. De façon intéressante, nous avons observé que l'absence d'interaction avec le soi n'affecte pas le niveau d'expression de $Foxp3$ mais que la reconnaissance du soi induit une signature transcriptionnelle unique et des caractéristiques fonctionnelles qui ne sont pas liées à $Foxp3$.

Dans une seconde étude, nous avons mis en évidence que, chez la souris jeune adulte, l'expression de Ly-6C permet d'identifier deux sous-populations de Tregs distinctes présentant des différences phénotypiques et fonctionnelles. En particulier, nous avons observé que les Tregs $Ly-6C^-$ présentent un phénotype plus activé et régulateur que leurs homologues $Ly-6C^+$ et que seules les premières sont fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*. Nous avons également montré un lien étroit entre expression de Ly-6C et autoréactivité, les Tregs $Ly-6C^-$ recevant plus de signaux du TCR que les Tregs $Ly-6C^+$. Finalement, nous avons observé que seuls les Tregs $Ly-6C^-$ se maintiennent à la périphérie avec le temps, suggérant l'existence d'une sélection périphérique permettant la survie préférentielle des Tregs les plus fonctionnels.

Au cours de ma thèse, nous avons ainsi pu démontrer que les interactions avec le soi étaient indispensables et nécessaires pour la fonctionnalité, le phénotype et l'homéostasie des Tregs.

ABBREVIATIONS	- 1 -
INTRODUCTION	- 5 -
I. Préambule.....	- 6 -
II. La tolérance immunitaire.....	- 7 -
A. La tolérance centrale	- 7 -
1. La sélection positive	- 7 -
2. La sélection négative.....	- 9 -
3. La sélection agoniste.....	- 11 -
B. La tolérance périphérique	- 13 -
1. Les mécanismes de tolérance périphérique.....	- 13 -
a) <i>L'ignorance et l'anergie</i>	- 13 -
b) <i>La déviation immune</i>	- 14 -
c) <i>La délétion</i>	- 15 -
2. Les mécanismes impliquant d'autres cellules immunitaires.....	- 16 -
a) <i>Les cellules dendritiques tolérogènes</i>	- 16 -
b) <i>Les lymphocytes T suppresseurs</i>	- 17 -
➤ Les lymphocytes T CD8 ⁺ régulateurs	- 17 -
➤ Les lymphocytes T CD4 ⁺ Tr1	- 20 -
➤ Les lymphocytes T double-négatifs (LTDN).....	- 20 -
➤ Les lymphocytes NKT	- 20 -
III. Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ Foxp3⁺	- 21 -
A. Caractérisation	- 21 -
1. Caractérisation phénotypique.....	- 21 -
2. Foxp3 : le marqueur spécifique ?.....	- 23 -
B. Ontogénie des Tregs CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	- 25 -
1. Ontogénie des nTregs	- 25 -
a) <i>Le signal TCR</i>	- 26 -

b)	<i>Les signaux de co-stimulations</i>	- 28 -
c)	<i>Le rôle de l'IL-2</i>	- 28 -
d)	<i>Les CPAs thymiques et AIRE</i>	- 30 -
e)	<i>Régulation de l'expression de Foxp3</i>	- 32 -
2.	<i>Ontogénie des iTregs</i>	- 35 -
a)	<i>Mise en évidence</i>	- 35 -
b)	<i>Mécanismes de différenciation des iTregs</i>	- 35 -
C.	<i>Les fonctions suppressives des Tregs</i>	- 37 -
1.	<i>Mécanismes effecteurs des Tregs</i>	- 37 -
a)	<i>Les cytokines immunosuppressives</i>	- 37 -
➤	<i>L'IL-10</i>	- 37 -
➤	<i>Le TGF-β</i>	- 38 -
➤	<i>L'IL-35</i>	- 38 -
b)	<i>La cytolyse</i>	- 39 -
c)	<i>Les altérations métaboliques</i>	- 40 -
➤	<i>Les ectoenzymes : CD39 et CD73</i>	- 40 -
➤	<i>L'AMP cyclique (AMPC)</i>	- 40 -
➤	<i>La consommation d'IL-2</i>	- 41 -
d)	<i>La modulation des cellules dendritiques</i>	- 41 -
2.	<i>Les Tregs : des cellules régulatrices professionnelles</i>	- 43 -
a)	<i>Les cellules immunitaires ciblées par les Tregs</i>	- 43 -
b)	<i>Les Tregs dans la réponse CD8</i>	- 43 -
c)	<i>Les Tregs inhibent différentes classes de réponses immunes</i>	- 44 -
d)	<i>Blimp-1 et IRF4 dans la différenciation des Tregs effecteurs.</i>	- 46 -
3.	<i>L'impact des Tregs dans l'organisme</i>	- 48 -
a)	<i>Auto-immunité</i>	- 48 -
b)	<i>Transplantation</i>	- 49 -

c) <i>La tolérance fœto-maternelle</i>	- 51 -
d) <i>Les maladies infectieuses</i>	- 53 -
e) <i>Les Tregs dans le cancer</i>	- 55 -
D. Facteurs impliqués dans l'homéostasie et la fonction des Tregs	- 58 -
1. Le rôle des interactions avec le soi	- 58 -
2. Le rôle des cytokines de la famille γc	- 60 -
3. Effets des molécules inflammatoires	- 61 -
a) <i>L'IL-1, l'IL-6 et le TNFα</i>	- 61 -
b) <i>Les récepteurs de la famille du TNF</i>	- 63 -
4. Les autres signaux de survie	- 64 -
5. Mécanismes d'apoptose des Tregs	- 66 -
6. Stabilité et plasticité des Tregs	- 69 -
RESULTATS	- 72 -
Article 1	- 73 -
Article 2	- 94 -
DISCUSSION	- 130 -
I. Discussion des résultats	- 131 -
A. L'autoréactivité est nécessaire aux fonctions suppressives des Treg	- 131 -
B. L'impact de la reconnaissance du soi sur l'activation des Tregs.	- 133 -
C. Autour de Foxp3	- 135 -
D. Les interactions avec le soi permettent l'expression de molécules suppressives..	- 136 -
E. Une signature transcriptionnelle unique du soi	- 140 -
F. Les interactions avec le soi stabilisent le pool de Tregs périphériques.	- 141 -
II. Points de vue et Perspectives	- 142 -
III. Conclusion	- 145 -
ANNEXES	- 146 -
Article 3	- 147 -

Article 4	- 157 -
Article 5	- 170 -
BIBLIOGRAPHIE	- 178 -

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

AhR : Aryl hydrocarbon Receptor

AICD : Activation-Induced Cell Death

AIRE : Autoimmune Regulator

AMPc : Adénosine Mono-Phosphate Cyclique

AP-1 : Activator protein 1

APECED : Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidosis Ectodermal Dystrophy

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

Bcl : B-cell lymphoma/leukemia

BCR : Récepteur des cellules B (B-cell Receptor)

BrdU : BromodéoxyUridine

CARMA1 : CARD-containing MAGUK protein 1

CD : Cluster de Différenciation (Cluster of Differentiation)

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNS : Conserved non-coding sequences

COX-2 : Cycloxygénase-2

CFA : Adjuvant Complet de Freund (Compleat Adjuvant of Freund)

CPAs : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CREB : c-AMP Response Element-Binding

cTECs : Cellules Epithéliales corticales Thymiques

CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocytes Antigen-4

DCs : Cellules Dendritiques

DN : Double Négatif

DP : Double Positifs

EAE : Encéphalite Auto-immune Expérimentale

Ebi3 : Epstein-barr-virus-induced gene 3

EGF : Facteur de Croissance Épidermique (Epidermal Growth Factor)

Fas : Fatty Acid Synthase

Fas-L : Ligand de FAS

Foxp3 : Forkhead box p3

FR4 : récepteur au folate 4 (Folate Receptor 4)

Gal-1 : Galectine-1

GFP : Green Fluorescent Protein

GITR : Récepteur au TNF Induit par les Glucocorticoïdes (Glucocorticoïd Induced TNF Receptor)

GrzmB : Granzyme B

GVHD : Maladie du greffon contre l'hôte (Graft Versus Host Disease)

HLA : Human Leucocyte Antigen

HP1 : Heterochromatin protein 1

HSCT : Hematopoietic Stem Cell Transplantation

HSV : Herpes Simplex Virus

IBD : Maladie Inflammatoire de l'Intestin (Inflammatory Bowel Disease)

ICOS : Induced Costimulation

IDO : Indoleamine 2,3 Dioxygenase

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : InterLeukine

iNKT : invariant Natural Killer T cell

IPEX : Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome

IRF4 : Interferon regulatory factor 4

iTregs : Lymphocytes T régulateurs induits

JAK : Janus-Associated Kinase

KLRG-1 : Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1

LAG-3 : Lymphocyte-activation gene 3

LAP : Liver-enriched transcriptional Activator Protein

LBs : Lymphocytes B

LCMV : Lymphocytic Choriomeningitis Virus

LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1

LIP : Lymphopenia Induced Prolifération

LPS : Lipopolysaccharide

LTconvs : Lymphocytes T conventionnels

LTDN : Lymphocytes T Double Négatifs

LTnaïfs : Lymphocytes T naïfs

LTs : Lymphocytes T

Ly-6C : Lymphocyte antigène 6C

MBP : Myelin Basic Protein

MDSC : Cellules Myéloïdes Suppressives (Myeloid Derived Suppressor Cells)

miR : Micro ARN

MO : Moelle Osseuse

mTECs : Cellules Epithéliales médullaires Thymiques

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NF-κB : Nucleaaf Factor of activated T-cells

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

nIELs : Lymphocytes Intra-Epithéliaux naturels

NK : Natural Killer

NOD : Non Obese Diabetic

Nrp-1 : Neuropiline-1

nTh17 : Lymphocytes Th17 naturels

nTregs : Lymphocytes T régulateurs naturels

OVA : Ovalbumine

pCMH : peptide du soi associé à une molécule du Complexe Majeur d’Histocompatibilité

pDCs : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes

PD-1 : Programmed Death-1

PD-L1/2 : Programmed Death-Ligand 1 ou 2

PDE3B : Phosphodiesterase 3B

PGE₂ : Prostaglandin E₂

PI3K : Phosphoinositide-3 Kinase

PIAS1 : Protein Inhibitor of activated STAT1

PKCθ : Protein Kinase C theta

Plzf : Promyelocytic leukaemia zinc finger protein

PPAR : Peroxysome Proliferator-Activated Receptor

RAG : Recombination Associated Gene

RANK : Receptor Activator of Nuclear Factor κ B

RFP : Red Fluorescent Protein

ROR : Related Orphan Receptor

SCFAs : Short-Chain Fatty Acids

Smad : Mothers against decapentaplegic homolog

SP : Simple Positif

STAT : Signal Tranducer and Activator of Transcription

T1D : Diabète de Type 1

TAAs : Tumor Associated Antigens

TCR : Récepteur des cellules T (T-cell Receptor)

Tfh : Lymphocytes T folliculaires

Tfr : Lymphocytes T régulateurs folliculaires

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TGF- β R : récepteur au TGF- β

Th : Lymphocyte T helpers

TNF : Tumor Necrosis Factor

TLRs : Toll Like Receptors

Tr1 : Lymphocyte T régulateur de type 1

Tr35 : Lymphocytes T régulateurs 35

TRAIL : Tumor necrosis factor Related Apoptosis Induced Ligand

TRAs : Tissue Restricted Antigens

TRP-1 : Tyrosinase Related Protein-1

TSDR : Treg-Specific Demethylated Region

Tregs : Lymphocytes T régulateurs

VEGF : Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial (Vascular Endothelial Growth Factor)

YFP : Yellow Fluorescent Protein

Zap70 : Zeta-chain Associated protein kinase 70

INTRODUCTION

I. Préambule

Le système immunitaire assure la défense de l'organisme. Pour ce faire, les stratégies défensives, développées par les organismes vivants au cours de l'évolution, ont atteint un niveau très complexe notamment chez les mammifères. Le système immunitaire est l'un des systèmes de protection les plus évolués et l'un des plus complexes. Il assure la défense de l'organisme contre une grande diversité d'éléments étrangers. Pour cela, il reconnaît différentes structures moléculaires appelées antigènes et doit être capable de distinguer les antigènes étrangers de ceux de l'organisme. Ainsi, les antigènes proviennent de l'organisme lui-même, « le soi », ou bien de micro-organismes étrangers, le « non-soi », potentiellement dangereux. Burnet, en 1969 (Burnet, 1969) a été l'un des premiers immunologistes à définir le soi et le non-soi comme critères d'immunogénicité pour la mise en place d'une réponse immunitaire. Cette théorie ne permet pas d'expliquer les réponses immunitaires dirigées contre les tumeurs ou encore la tolérance immunitaire envers la flore commensale. En 1994, Polly Matzinger propose la théorie du danger (Matzinger, 1994) comme critère de la mise en place d'une réponse immunitaire. Elle est basée sur le fait que toute réponse immunitaire se déclenche suite à l'apparition de signaux de danger issus de tissus endommagés. Plusieurs théories au cours du temps ont voulu définir les mécanismes précis de la mise en place d'une réponse immunitaire; ces théories s'affinent notamment grâce à la compréhension de plus en plus précise du système immunitaire et surtout de ses acteurs. Le système immunitaire a deux composantes effectrices : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme, les mécanismes mis en jeu par l'immunité innée ont été conservés au cours de l'évolution. Elle est capable de mettre en place une réponse immunitaire efficace et très rapide grâce à ses principaux acteurs comme les cellules phagocytaires, capables de phagocyter les micro-organismes étrangers ou encore comme les cellules tueuses appelées cellules NK (Natural Killer), capables de sécréter des substances détruisant ou inhibant les cellules infectées par des micro-organismes étrangers. L'immunité adaptative représente une immunité très spécialisée qui met en jeu les lymphocytes B (LBs) et les lymphocytes T (LTs). Ces cellules sont caractérisées par l'expression, à la surface de leur membrane plasmique, de récepteurs spécifiques de l'antigène, respectivement le BCR (B Cell Receptor) et le TCR (T Cell Receptor). Ce dernier est capable de reconnaître une très grande variété d'antigènes différents. En effet, les réarrangements des gènes du TCR permettent de générer environ 10^{15} récepteurs différents, ce qui permet la reconnaissance potentielle d'une grande variété d'antigènes du non soi. Lors de

la différenciation des LTs et du réarrangement de leur TCR, il y a apparition de cellules T autoréactives dont certaines sont néfastes pour l'organisme et peuvent générer des maladies auto-immunes. Le développement d'un répertoire de LTs fonctionnel est basé sur la spécificité du TCR. C'est un processus effectué au niveau du thymus ; il permet la sélection d'environ 1 à 2 millions de LTs CD4⁺ et CD8⁺ naïfs par jour dans une souris jeune adulte. La sélection thymique génère un répertoire de LTs réactifs contre le non-soi et, lors de cette sélection, il y a élimination entre autres des thymocytes les plus autoréactifs : c'est la tolérance centrale. Enfin, d'autres mécanismes existent en périphérie et permettent de tolérer les LTs autoréactifs échappant à cette sélection thymique. Je présenterai de façon très succincte les mécanismes de tolérance centrale, mon sujet de thèse étant centré sur un mécanisme de tolérance périphérique.

II. La tolérance immunitaire

A. La tolérance centrale

Les précurseurs hématopoïétiques sont issus de la moelle osseuse (MO) et migrent dans le thymus, organe lymphoïde primaire permettant la génération de LTs matures. Une fois matures, ils migrent dans les différents organes lymphoïdes secondaires, principalement les ganglions lymphatiques et la rate. Le processus d'éducation des LTs comporte deux grandes étapes : la sélection positive et la sélection négative.

1. La sélection positive

Tout d'abord les précurseurs T pénétrant dans le thymus passent par 4 stades appelés DN (Double-Négatifs) c'est-à-dire qu'ils n'expriment pas les co-récepteurs CD4 et CD8. C'est au cours du stade DN1 que se détermine l'engagement vers la différenciation en LTs ; l'interaction de Notch avec son ligand Dll-4 est essentielle à ce stade pour le réarrangement du TCR et l'engagement vers la lignée T (Maillard et al., 2005). Puis, au stade DN2 il y a le choix des réarrangements d'un TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, qui sont initiés par la recombinaison des segments D-J (Carpenter and Bosselut, 2010). Dans la continuité de la différenciation, au stade DN3, les réarrangements continuent avec la recombinaison des segments V et DJ (Kragel, 2009). Enfin, toujours au stade DN3, les thymocytes vont subir la sélection β qui consiste à réarranger les gènes de la chaîne β du TCR. À cette étape les thymocytes qui possèdent un pré-TCR, composé d'une chaîne β fonctionnelle et d'une chaîne α invariante, recevront des signaux de survie et de prolifération pour continuer leur route vers la région corticale sous-capsulaire. A la suite de cette sélection, les thymocytes sont au stade DN4. Ils

initient la co-expression de CD4 et CD8 et passent au stade DP (Double-Positif), c'est-à-dire qu'ils acquièrent l'expression des marqueurs CD4 et CD8 puis commencent le réarrangement des gènes de la chaîne α du TCR (Figure 1). À ce niveau de maturation, les thymocytes vont subir la première grande étape de sélection thymique : la sélection positive.

Au cours de cette étape, les thymocytes doivent reconnaître, via leur TCR, un complexe composé d'un peptide du soi associé à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (pCMH) exprimé par les cTECs (cellules Epithéliales Corticales Thymiques). Le rôle des interactions avec le CMH est de dicter l'avenir des thymocytes DP en LTs CD4 SP (Simple Positif) ou CD8 SP mais aussi de définir le répertoire des LTs (Marrack et al., 2008). Le devenir des thymocytes DP va dépendre de l'affinité du TCR qu'ils expriment pour les complexes pCMH. Les thymocytes DP qui possèdent un TCR ne reconnaissant pas de pCMH du soi, ou avec une affinité très faible, ne reçoivent pas de signaux de survie et meurent par apoptose : c'est la mort par négligence (Figure 2). En revanche, les thymocytes possédant un TCR avec une affinité minimale pour le complexe pCMH du soi sont sélectionnés positivement : ils reçoivent des signaux de survie et ils initient leur engagement vers les lignées CD4 ou CD8 selon leur affinité respectivement pour le CMH de classe II ou de classe I (Figure 1).

Le passage du stade DP à SP est complexe et fait encore débat. Le modèle le plus récent a été proposé par Alfred Singer. D'après lui, le signal TCR reçu par les thymocytes DP entraîne une diminution de l'expression de CD8 et de la sensibilité à l'IL-7. Les thymocytes passent à un stade $CD4^+ CD8^{\text{faible}}$ considéré comme intermédiaire au stade SP. Puis, si le thymocyte reconnaît un complexe pCMH de classe II, la perte d'expression de CD8 continue et le thymocyte atteint le stade CD4 SP. Tandis que si le thymocyte dont le TCR possède une affinité pour le complexe pCMH de classe I alors la perte d'expression du CD8 entraîne une déstabilisation du complexe et interrompt le signal TCR. Cela permet de réacquérir une sensibilité à l'IL-7 qui entraîne la réexpression du CD8 et l'arrêt de la transcription de CD4 pour atteindre le stade CD8SP (Brugnera et al., 2000; Singer et al., 2008; Yu et al., 2003).

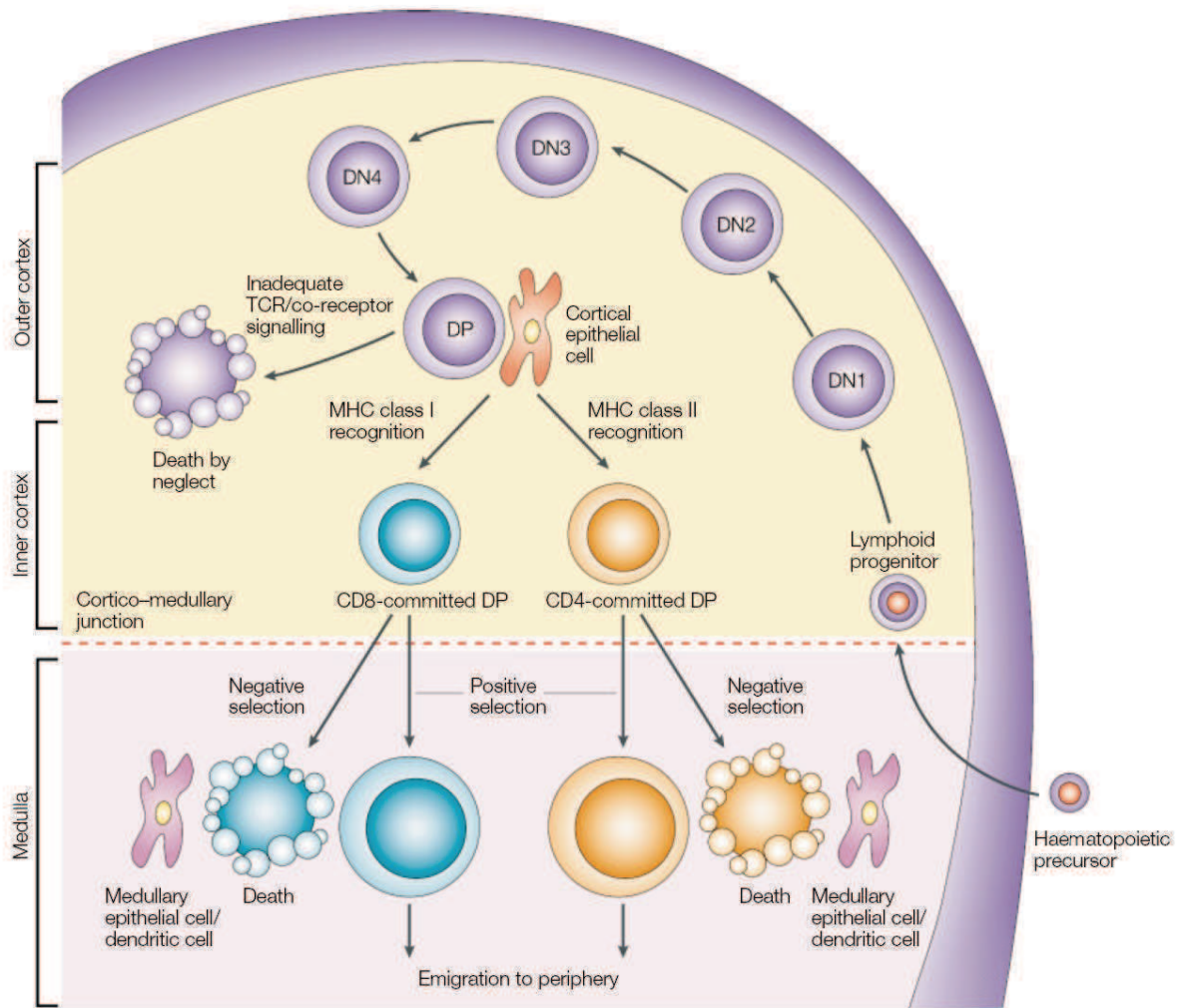


Figure 1 : Schéma récapitulatif du développement des lymphocytes T dans le thymus. DN = Double-Négatif, DP = Double-Positif. *Issu de (Germain, 2002).*

Lors de ce processus de sélection, il y a génération de clones autoréactifs plus ou moins affins pour le soi. Les thymocytes continuent leur voyage au sein du thymus pour atteindre la zone médullaire appelée médulla où se déroule la deuxième grande étape de la sélection thymique : la sélection négative.

2. La sélection négative

La médulla est essentiellement constituée de mTECs (Cellules Epithéliales médullaires Thymiques) et de DCs (Cellules Dendritiques). Les thymocytes SP interagissent avec ces différentes CPAs (Cellules Présentatrices d'Antigènes) afin de tester leur reconnaissance envers les complexes pCMH du soi. Les thymocytes présentant un TCR de forte affinité pour le soi sont éliminés par apoptose. Ce phénomène est la délétion clonale (Figure 2). Elle permet la délétion des clones fortement autoréactifs qui pourraient être néfastes pour

l'organisme. La sélection négative est assurée, en partie, par les mTECs. Elles expriment la protéine AIRE (AutoImmune REgulator) qui permet une faible expression d'antigènes tissulaires périphériques (Tissue Restricted Antigens). L'expression des TRAs est suffisante pour induire une tolérance (Derbinski et al., 2001) et l'expression d'AIRE est indispensable au bon fonctionnement de la sélection négative chez la souris. En effet, la délétion du gène *Aire* entraîne une diminution de l'expression de nombreux TRAs par les mTECs (Anderson et al., 2002). Enfin, chez l'homme, une mutation d'AIRE entraîne le développement d'une maladie autoimmune nommée APECED (Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidosis Ectodermal Dystrophy) (Nagamine et al., 1997).

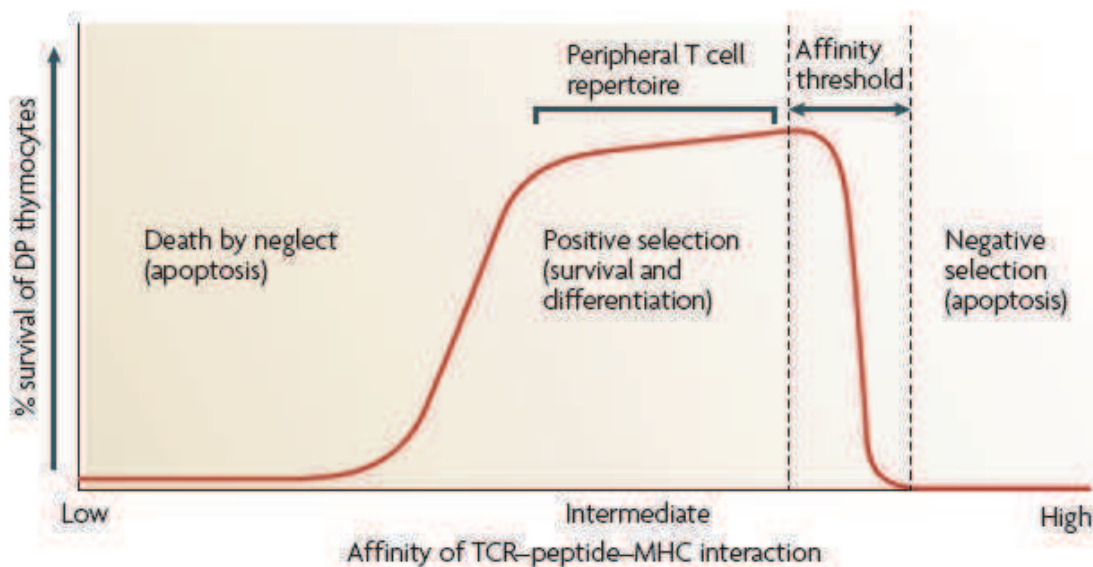


Figure 2 : Modèle d'affinité de la sélection thymique.

Issu de (Klein et al., 2009).

Les DCs jouent également un rôle important dans la sélection négative. Il existe 3 types de DCs dans le thymus : les DCs périphériques qui migrent dans le thymus, les DCs issues du thymus et les DCs plasmacytoïdes (pDCs) (Donskoy and Goldschneider, 2003; Li et al., 2009). Le rôle des pDCs dans la sélection négative n'est pas établi. Les DCs périphériques, quant à elles, peuvent charger des antigènes périphériques et migrer dans le thymus afin d'établir une tolérance envers ces antigènes (Bonasio et al., 2006). Enfin, les DCs issus du thymus utiliseraient des processus particuliers. En effet, elles seraient capables de capter les antigènes fournis par les mTECs après apoptose : en mourant, les mTECs libèrent des vésicules contenant des complexes pCMH qui sont transférés aux DCs thymiques (Humblet et al., 1994). Enfin, il a plus récemment été démontré qu'il pouvait y avoir un échange de domaines membranaires intacts contenant des complexes pCMH entre les mTECs et les DCs (Millet et al., 2008). Il est à noter dans ces deux processus, que le transfert se fait uniquement

dans le sens des mTECs vers les DCs. Les mTECs et les DCs ont donc un rôle primordial dans l'efficacité de la sélection négative.

D'autres études indiquent que la sélection négative pourrait se dérouler dans le cortex et être orchestrée par les cTECs et les DCs corticales (McCaughy et al., 2008). Malgré le fait qu'en condition physiologique, dans une souris C57BL/6 non transgénique, l'expression d'AIRE soit située dans les mTECs, les cTECs peuvent exprimer certains TRAs. De plus, il a été prouvé que les cTECs pouvaient exprimer AIRE dans chez les souris déficientes pour la protéine RAG2 (Derbinski et al., 2001). Enfin, deux études récentes montrent le rôle des cTECs et plus particulièrement des DCs corticales dans la sélection négative. La première démontre que les thymocytes autoréactifs sont éliminés même au stade DN, suggérant un rôle du cortex dans la sélection négative (Baldwin et al., 2005). La seconde renforce cette idée en montrant que ce sont principalement les DCs corticales qui sont responsables de la sélection négative (McCaughy et al., 2008). Bien qu'encore débattu, il semble quand même que la médulla serait la zone principale de la sélection négative mais qu'elle peut éventuellement se dérouler dans le cortex.

La sélection thymique permet donc de générer des LTs matures reconnaissant des antigènes étrangers mais ayant une faible affinité pour le soi. La plupart des LTs, notamment les plus fortement autoréactifs, sont éliminés au cours de la sélection négative, celle-ci n'en reste pas moins imparfaite et laisse passer des cellules très autoréactives, qui ne sont pas toutes néfastes pour l'organisme. En effet, certaines cellules du système immunitaire se développent dans le thymus en raison de leur forte réactivité pour le soi.

3. La sélection agoniste

Certains thymocytes exprimant des TCRs de forte affinité pour le soi prennent une orientation différente du fait de leur forte autoréactivité, comme les iNKT (Moran et al., 2011), les LTs intra-épithéliaux naturels $CD8\alpha\alpha^+$ de l'intestin (nIEL) (Leishman et al., 2002), les lymphocytes Th17 naturels (nTh17) (Marks et al., 2009) et les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg). Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sur lesquelles je reviendrai plus longuement, sont l'objet principal de cette thèse. Le développement de chaque lignage nécessite des facteurs de transcription différents et spécifiques (Figure 3) : le facteur Plzf (Promyelocytic leukaemia zinc finger protein) pour les iNKT, RoR γ t (Related Orphan Receptor) pour les nTh17 et Foxp3 (Forkhead box P3) pour les nTregs. Des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux caractériser le développement des nIELs.

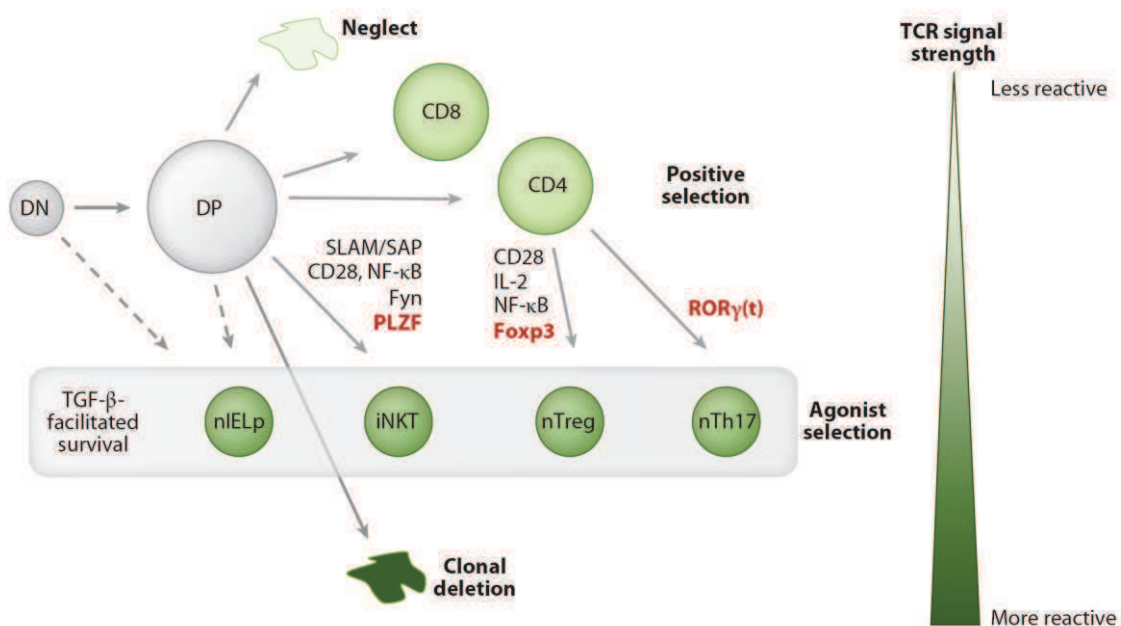


Figure 3 : La sélection positive et la sélection agoniste. Issu de (Stritesky et al., 2012)

La réactivité des TCR pour les peptides du soi associés aux molécules de CMH de classe II (indiqué par l'échelle de couleurs, le vert le plus foncé indiquant le plus auto-réactif) joue un rôle déterminant dans le devenir des LTs. Les cellules qui n'expriment pas un TCR, ou qui expriment un TCR avec aucune autoréactivité, mourront par négligence. Celles qui ont une faible affinité pour le soi subissent la sélection positive pour devenir des LTs CD4⁺ ou CD8⁺. Ceux qui ont une trop forte affinité pour le soi subissent la délétion clonale afin de préserver la tolérance au soi. Cependant, plusieurs sous-populations de lymphocytes se développent aussi dans le thymus: les LTs CD8αα⁺ ou intra-épithéliaux (nIELp), les LTs invariants « Natural Killer » (iNKT), les nTreg, et les LTs helper naturels producteurs d'IL-17 (nTh17). Éléments de preuve résumés dans cette étude suggère que ces quatre sous-ensembles expérience interactions fortes avec des peptides du soi au cours de leur développement (sélection agoniste). Chacun de ces sous-ensembles nécessite des facteurs moléculaires distincts (dont certains sont énumérés)

Nous venons de voir que les différentes étapes de la sélection thymique permettent, de sélectionner des clones lymphocytaires ayant une réactivité minimale contre le soi, et d'éliminer les LTs les plus auto-réactifs, mais également, de sélectionner des sous populations lymphocytaires reconnaissant le soi, pouvant être potentiellement dangereuses (nTh17).

Certains antigènes ne sont pas exprimés dans le thymus mais uniquement en périphérie et d'autres sont exprimés que à partir d'une période de la vie comme les antigènes de la puberté. De plus, les LTconvs CD4⁺ ou CD8⁺ auto-réactifs peuvent échapper à la sélection thymique et migrer en périphérie, s'activer et déclencher une maladie auto-immune. La sélection thymique est donc imparfaite et ne permet pas complètement d'éviter de sélection des clones auto-réactifs. Pour limiter cela, d'autres mécanismes moléculaires et cellulaires permettent de protéger l'organisme contre l'activation des LTs auto-réactifs à la périphérie.

B. La tolérance périphérique

Plusieurs mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer la tolérance périphérique. Certains sont intrinsèques aux LTs et d'autres font intervenir d'autres cellules du système immunitaire. Ainsi, dans cette partie, je vais décrire principaux mécanismes mis en jeu par le système immunitaire pour prévenir le développement de maladies auto-immunes.

1. Les mécanismes de tolérance périphérique

a) L'ignorance et l'anergie

L'ignorance des LTs face aux auto-antigènes est un mécanisme passif (Figure 4a). En effet, les auto-antigènes séquestrés dans des zones dites immuno-privilegiées (Alferink et al., 1998), c'est-à-dire difficiles d'accès pour les LTs à l'état basal, ou alors exprimés en très faible quantité, ne sont pas reconnus et l'activation des LTs auto-réactifs est ainsi évitée (Kurts et al., 1998). D'autres mécanismes dits actifs rentrent également en jeu dans la tolérance périphérique. L'anergie qui résulte d'une activation des LTs en l'absence de co-stimulation, c'est-à-dire, entre autres, la stimulation de CD28 via les molécules de co-stimulations B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86), est l'un d'entre eux. L'anergie a été démontrée pour la première fois dans des expériences *in vitro*. Elle a été décrite comme la conséquence de l'engagement du TCR sans co-stimulation (Jenkins and Schwartz, 1987). Plus tard, il a été démontré que d'autres molécules sont impliquées dans l'induction de l'anergie des LTs, notamment les protéines CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) et PD-1 (Programmed cell Death 1) (Figure 4b). En effet, le blocage *in vivo* des deux molécules CD80 et CD86 exprimées par les DCs entraîne une inhibition de la tolérance périphérique (Lane et al., 1996), ce qui n'était pas en accord avec les résultats précédents. Cette énigme a été résolue par la découverte de la molécule CTLA-4, un homologue de CD28, qui possède une signalisation inhibitrice induisant l'anergie des LTs (Krummel and Allison, 1995), (Walunas et al., 1996). Une autre protéine impliquée dans l'anergie des LTs est PD-1. Celle-ci est exprimée plus fortement par les LTs anergiques (Lechner et al., 2001). Comme CTLA-4, PD-1 génère un signal inhibiteur lors de sa ligation avec ses ligands PD-L1 ou PD-L2 (Programmed cell Death Ligand 1 ou 2). Il en résulte une inhibition de la production cytokinique des LTs (Freeman et al., 2000).

Néanmoins, l'ignorance et l'anergie ne permettent pas l'élimination définitive des LTs auto-réactifs. L'organisme n'est donc pas à l'abri d'une levée de l'anergie ou de l'ignorance.

D'autres mécanismes entrent alors en jeu pour l'induction de la tolérance périphérique. La déviation immune est l'un d'entre eux et elle intervient après l'activation des LTs.

b) La déviation immune

Après l'activation des LTs auto-réactifs, il peut y avoir une réorientation de la réponse immunitaire, vers une réponse non délétère : c'est la déviation immune (Figure 4c). Pour se différencier en LTs effecteurs, un LTnaïfs doit recevoir plusieurs signaux : le signal TCR, les signaux de co-stimulations et le signal cytokinique. Ce troisième signal est très important pour l'orientation du LT car le choix de la lignée effectrice va dépendre du signal reçu. En effet, l'IL-12 et l'IFN- γ induisent vers une différenciation de type Th1 alors que l'IL-4 va favoriser la différenciation Th2. Une fois différenciés, les LTs effecteurs sont de gros producteurs de cytokines et de manière intéressante certaines de ces cytokines sont capables d'inhiber la différenciation en Th des LTnaïfs. Par exemple, l'IL-4 produite par les Th2 inhibe la différenciation Th1 tandis que l'IFN- γ inhibe la différenciation Th2. De nombreuses maladies auto-immunes ont été associées à une réponse de type Th1 comme le diabète de type 1 ou la sclérose en plaques. Ainsi, le changement ou une différenciation Th2 a permis d'expliquer, dans plusieurs modèles d'auto-immunités Th1 dépendants comme l'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) (Young et al., 2000) ou le diabète de type 1 chez la souris NOD (Non Obese Diabetic) (Bradley et al., 1999), la diminution des symptômes de la maladie. La présence de cytokines immuno-régulatrices comme le TGF β (Transforming Growth Factor) peut provoquer cette déviation immune. En effet, l'expression du TGF β dans les îlots pancréatiques d'une souris NOD protège celle-ci du diabète en favorisant la présentation des antigènes par les macrophages, ce qui provoque une réponse immunitaire déviée majoritairement vers une réponse Th2 (King et al., 1998).

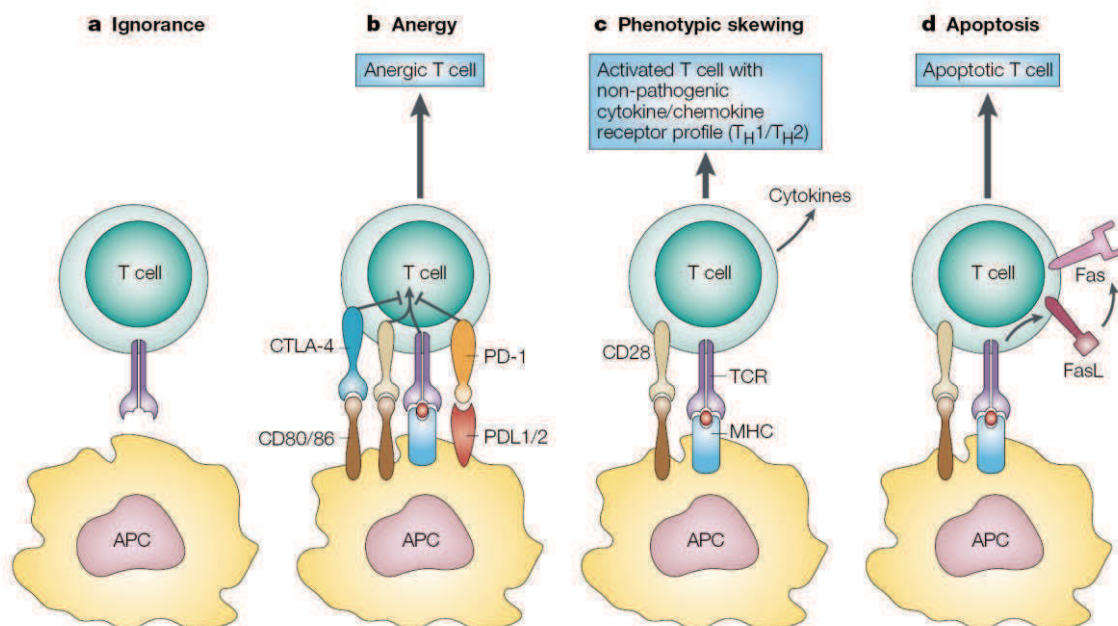


Figure 4 : Mécanismes de tolérance périphérique.
Issu de (Walker and Abbas, 2002)

c) La délétion

Il existe un autre mécanisme actif de tolérance périphérique : c'est la délétion clonale (Figure 4d). En effet, lorsqu'un LT est activé, il exprime la protéine Fas (Fatty Acid Synthase) (CD95) et lorsqu'il rencontre des cellules exprimant son ligand, FasL (Fas Ligand), le plus souvent exprimé par les CPAs (Cellules Présentatrices d'Antigènes), Fas induit un signal d'apoptose à la cellule (Suda et al., 1993). Il a été démontré, dans un autre modèle de souris transgénique pour un TCR de spécificité connu, que l'injection du peptide reconnu entraîne la mort cellulaire des LTs après activation uniquement en présence de Fas (Singer and Abbas, 1994). Enfin, pour conclure, notons que FasL est exprimé dans les sites immuno-privilegiés tels que la chambre antérieure de l'œil, ce qui permet d'éliminer les LTs ayant passé la barrière protégeant le site (Griffith et al., 1995). Dans un modèle de cross-tolérance dans lequel les cellules β du pancréas expriment l'OVA, une autre voie moléculaire peut être mise en jeu dans la délétion de clones auto-réactifs. En effet, il a été démontré que les DCs drainant le pancréas pouvaient cross-présentées les antigènes issus du pancréas et induire une cross-tolérance. L'injection de LTs CD8⁺ OT-I induit dans un premier temps leur activation et leur prolifération puis dans un second temps leur délétion. Cette délétion est médiée par le facteur pro-apoptotique Bim qui induit l'apoptose de ces LTs CD8⁺ OT-I transférés (Davey et al., 2002).

2. Les mécanismes impliquant d'autres cellules immunitaires

a) Les cellules dendritiques tolérogènes

Les DCs ont un rôle crucial comme régulateur des réponses innée et adaptative : ce sont des CPAs professionnelles capable d'acquérir, de traiter et de présenter les antigènes aux LTs. Elles se différencient en fonction de l'environnement et des signaux qu'elles reçoivent comme la présence d'agents pathogènes ou la présence de tissus endommagés. Cette étape permet leur maturation et leur migration des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires, ainsi que l'induction des réponses lymphocytaires T. Inversement, les DCs sont également cruciales au maintien de la tolérance périphérique. Il existe plusieurs types et sous-populations de DCs tolérogènes. Tout d'abord, les iDCs qui représentent les DCs immatures, présentent les antigènes sans exprimer les molécules de co-stimulation. Elles induisent, de ce fait, l'anergie des LTs (Maldonado and von Andrian, 2010). Parmi les cDCs (DCs conventionnelles), définies chez la souris comme exprimant fortement CD11c, il y a 3 sous-populations pouvant être tolérogènes : les DCs $CD8\alpha^+$, les DCs $CD4^+CD8^-$ et les DCs double-négatives $CD4^-CD8^-$ (Morelli and Thomson, 2007). Puis, d'autres sous-populations ont été décrites comme étant tolérogènes : les pDCs, les DCs $CD103^+$, ou les cellules de Langherans. L'ensemble de ces populations peuvent et sont capables d'acquérir toutes les caractéristiques d'une DC tolérogène (Tableau 1) et donc de participer à la tolérance périphérique. Parmi les caractéristiques d'une DCs tolérogène, il y a la capacité d'induire des cellules T suppressives. En effet, selon le signal tolérogène qu'elles reçoivent et qui les différencie, elles induisent différents type de Tregs. Par exemple, les cellules de Langherans génèrent des Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ lorsqu'elles sont en contact avec le 1.25D3 (produit de la dégradation de la vitamine D3) alors que les DCs dermiques vont induire des LTs $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ producteur d'IL-10, les Tr1 (van der Aar et al., 2011). Les pDCs peuvent aussi induire des Tregs $Foxp3^+$ dans différentes situations : dans un cas, être impliquées dans l'établissement d'une tolérance orale (Goubier et al., 2008) ou dans un autre, dans la prévention du rejet de greffe (Ochando et al., 2006). Ainsi, nous venons de voir que les DCs sont capables d'induire une tolérance périphérique par différents mécanismes et notamment en induisant des Tregs $CD4^+Foxp3^+$.

Quelles sont les caractéristiques d'une DC tolérrogène?
1) Faible expression à la surface des molécules de CMH et des molécules de co-stimulations CD80/CD86
2) Faible production d'IL-12p70 et forte production d'IL-10 et d'IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygenase)
3) Résistantes à la maturation en réponse à des signaux de danger (ligands des TLRs par exemple)
4) Capables de générer, sélectionner et/ou faire proliférer des Tregs naturels (nTregs) ou des Tregs induites (iTregs)
5) Capables de promouvoir la mort apoptotique des LTs effecteurs
6) Capables de répondre à l'interaction avec les Tregs en augmentant leur production de molécules anti-inflammatoires
7) Capables de migrer dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires grâce à l'expression de récepteurs aux chimiokines
8) Résistantes à la mort par les NKs ou les LTs

Tableau 1 : Caractéristiques des cellules dendritiques tolérrogènes.

D'après (Morelli and Thomson, 2007)

Mais, en périphérie, il existe beaucoup d'autres types de cellules suppressives capables d'inhiber les LTs auto-réactifs et d'induire une tolérance périphérique. Elles ont également un intérêt thérapeutique car elles sont capables de transférer cette tolérance à d'autres receveurs.

b) Les lymphocytes T supresseurs

Il existe une grande variété de lymphocytes T exhibant des capacités régulatrices (Shevach, 2006), capables de moduler les réponses immunitaires. Beaucoup d'études ont été menées afin de comprendre les mécanismes d'induction des lymphocytes supresseurs afin de pouvoir les utiliser en immunothérapie. Certaines de ces cellules sont générées au niveau du thymus (iNKT, nTregs, LTs $CD8\alpha\alpha^+$). D'autres se différencient à la périphérie. Selon le contexte environnemental, l'induction de ces cellules est dépendante des antigènes présentés par les différentes CPAs et des cytokines environnantes. Je m'attarderai ici sur quelques populations de LTs régulateurs et je développerais plus en détail dans une seconde partie les Tregs $CD4^+$ exprimant le facteur de transcription Foxp3.

➤ Les lymphocytes T $CD8^+$ régulateurs

Les LTs $CD8^+$ jouent un rôle ambivalent dans les maladies auto-immunes. Ils peuvent, en effet, être des effecteurs pathogéniques ou bien des régulateurs négatifs. Il est connu, depuis les années 70, que des cellules T régulatrices $CD8^+$ existent : ce sont même les premières décrites dans la littérature (Cantor and Boyse, 1975). Longtemps tombées dans l'oubli, elles sont réactualisées au début des années 90 grâce à deux études menées dans le modèle d'EAE

(Jiang et al., 1992; Koh et al., 1992). Ces études montrent que lorsqu'on élimine les LTs $CD8^+$ avant une deuxième immunisation contre la protéine MBP (Myelin Protein Basic), les souris ne sont plus protégées et développent de nouveau l'EAE. Depuis, d'autres équipes ont démontré l'importance des lymphocytes T régulateurs $CD8^+$ dans la tolérance immunitaire et dans de nombreuses pathologies auto-immunes chez la souris et l'homme (Filaci et al., 2011; Pomie et al., 2008). Comme pour les LTs $CD4^+$, il existe plusieurs types de lymphocytes T régulateurs $CD8^+$ utilisant des mécanismes de suppression similaires aux Tregs $CD4^+$ (Figure 5) (Pomie et al., 2008; Tsai et al., 2011). Je ne présenterais brièvement que les lymphocytes T régulateurs $CD8^+$ les mieux caractérisés.

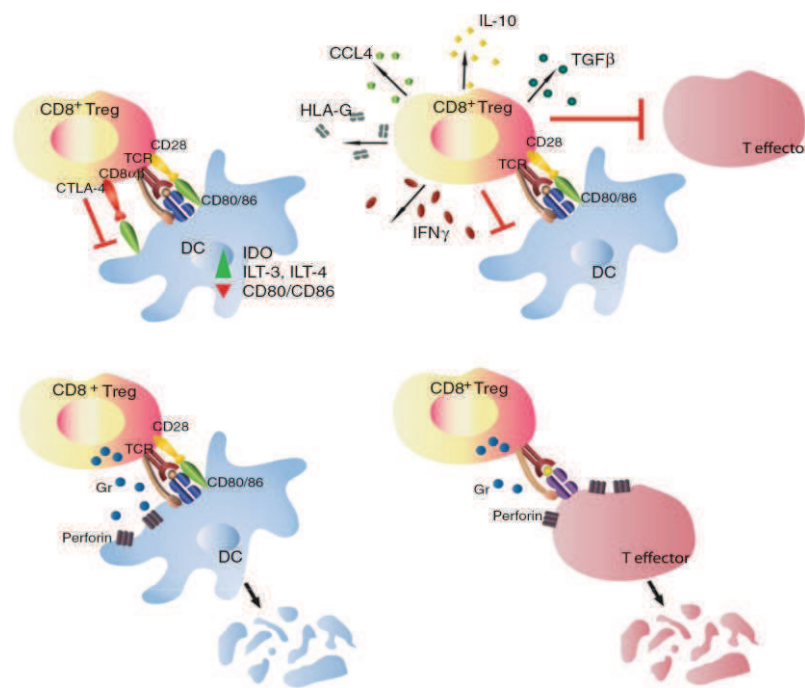


Figure 5 : Mécanismes de suppression des lymphocytes T régulateurs $CD8^+$
Issu de (Tsai et al., 2011)

Tout d'abord, il existe les lymphocytes T régulateurs $CD8^+$ Qa-1 restreintes. Qa-1 est une molécule du CMH de classe Ib. Son rôle dans l'auto-immunité a été démontré chez les souris déficientes pour Qa-1. En effet, ces souris sont plus sensibles au développement de l'EAE ce qui est associé à une plus forte réponse $CD4$ pathogénique lors d'une immunisation avec des peptides du soi (Hu et al., 2004). Plus récemment, une étude a démontré que ces Tregs limitent le déclenchement d'un lupus érythémateux disséminé en inhibant les LTs Tfh (lymphocytes T follicular helper) (Kim et al., 2011a). Parmi les autres lymphocytes T régulateurs $CD8^+$ décrits, on peut citer les lymphocytes T régulateurs $CD8^+$ $CD122^+$ qui

jouent un rôle dans l'homéostasie des LTs et la prévention de l'EAE (Rifa'i et al., 2004), (Lee et al., 2008) via la production d'IL-10.

Les LTs $CD8^+ CD28^-$ et les LTs $CD8\alpha\alpha^+$ intra-épithéliaux (IELs) protègent contre le développement de la colite (Menager-Marcq et al., 2006; Poussier et al., 2002) grâce à leur production d'IL-10 et de TGF β . Enfin, les lymphocytes T régulateurs $CD8^+ CD25^+$ présentent de fortes similitudes avec leurs homologues $CD4^+$, les Tregs $CD4^+ CD25^+$, car ils expriment les protéines GITR, CTLA-4, ainsi que le facteur de transcription Foxp3, et sont capables d'inhiber la prolifération des LTs conventionnels *in vitro* (Bienvenu et al., 2005). Enfin, il y a eu de nombreuses caractérisations d'autres sous-populations de lymphocytes T régulateurs $CD8^+$ intervenant dans la tolérance périphérique (Tableau 2).

Phénotype	Induction	Cytokines produites	Fonctions	Références
$CD8^+$	<i>In vivo</i> : Administration orale de MBP	TGF- β	<i>In vivo</i> : Protection contre l'EAE	(Lider et al., 1989) (Miller et al., 1992)
$CD8^+ CD75s^+$	<i>In vivo</i> : Administration orale d'OVA		<i>In vivo</i> : Inhibition des réponses Anticorps et T	(Kapp et al., 1995) (Zimring et al., 2003)
$CD8^+ CD25^+$	<i>In vitro</i> : cellules épithéliales pigmentaires de l'iris	TGF- β	<i>In vitro</i> : Inhibition de la prolifération des LTs répondeurs	(Sugita et al., 2006)
$CD8^+ CD11c^+$	<i>In vivo</i> : Activation de 4-1BB	IFN- γ	<i>In vivo/In vitro</i> : Inhibe les réponses T	(Myers et al., 2003) (Myers et al., 2005)
$CD8^+ Foxp3^+$	<i>In vitro</i> : OVA, TGF- β	TGF- β	<i>In vitro</i> : Inhibition de l'activation des LTs <i>In vivo</i> : Retarde le rejet d'une allogreffe cardiaque	(Kapp et al., 2006)
$CD8^+ Foxp3^+$	<i>In vivo</i> : Administration i.v d'Ig couplé à un peptide	TGF- β	<i>In vitro</i> : Inhibition de l'activation des LTs et LBs <i>In vivo</i> : Empêche l'apparition du lupus	(Hahn et al., 2005) (Singh et al., 2007) (Singh et al., 2008)
$CD8\alpha\alpha^+$ restreinte à Qa-1	<i>In vivo</i> : vaccination		<i>In vitro</i> : Inhibition de la prolifération des LTs <i>In vivo</i> : Empêche l'apparition de l'EAE	(Hu et al., 2004) (Tang et al., 2007)

Tableau 2 : Les différents lymphocytes T régulateurs $CD8^+$.
D'après (Pomie et al., 2008)

Bien que, plusieurs populations de lymphocytes T régulateurs $CD8^+$ aient été identifiées, certaines sont phénotypiquement et fonctionnellement très bien caractérisées. Mais, un effort majeur reste à fournir pour mieux définir leurs mécanismes effecteurs, leurs spécificités et leurs fonctions physiologiques.

➤ Les lymphocytes T CD4⁺ Tr1

En 1994, l'équipe de Maria-Grazia Roncarolo a mis en évidence une nouvelle population de LTs qui produisent de grandes quantités d'interleukine 10 (IL-10), qui est une cytokine anti-inflammatoire. Ces cellules produisent peu d'IL-2, pas d'IFN γ ni d'IL-4. Plus tard, ces cellules ont été mieux caractérisées et la même équipe a démontré qu'elles pouvaient être induites en ajoutant de l'IL-10 exogène lors d'une stimulation *in vitro*. Ces cellules sont, entre autre, capables de prévenir l'apparition de colite *in vivo* (Groux et al., 1997). Elles sont appelées lymphocyte T régulateur de type 1 (Tr1) et n'expriment pas le facteur de transcription Foxp3. Très récemment, son équipe a pu identifier deux marqueurs permettant de caractériser plus précisément ces cellules grâce à une analyse transcriptomique des Tr1 humains. En effet, elle a démontré que les cellules Tr1, chez l'homme et chez la souris, co-exprimaient de façon stable le CD49b et la protéine LAG-3 (Gagliani et al., 2013).

➤ Les lymphocytes T double-négatifs (LTDN)

D'autres populations de LTs peu connus ont des capacités régulatrices, notamment les LTs CD4⁻CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺ (LTDN). Ils représentent une petite fraction des LTs périphériques (1 à 3%). Depuis peu, il a été mis en évidence qu'ils possédaient des fonctions régulatrices. En effet, ils peuvent contrôler la prolifération *in vitro* des LTs CD4⁺ ou CD8⁺ et, *in vivo*, ils peuvent prévenir le rejet d'une xénogreffe chez la souris (Chen et al., 2005) et jouent un rôle dans la régulation de certaines maladies auto-immunes (Priatel et al., 2001). Leur mécanisme d'action est peu décrit mais il semble qu'ils aient la capacité de récupérer, à la surface des CPAs, les complexes pCMH qu'ils reconnaissent via leur TCR, puis de présenter à leur tour ces complexes aux autres LTs CD4⁺ ou CD8⁺ de même spécificité antigénique. Ces interactions induisent l'apoptose de ces LTs (Zhang et al., 2000).

➤ Les lymphocytes NKT

Il existe d'autres cellules T aux capacités suppressives comme les lymphocytes iNKT. Les iNKT (ou NKT de type 1) sont des LTs non conventionnels, possédant un TCR restreint à la molécule CD1d qui est une molécule du CMH de classe I, présentant des glycolipides. Ces lymphocytes expriment des marqueurs des cellules NK comme CD56 ou CD161. Leur TCR est composé d'une chaîne alpha invariante (V α 14-J β 18 chez la souris et V α 24-J β 18 chez l'homme), associée à certaines chaînes bêta (V β 2 - V β 7 - V β 8.2 pour la souris et V β 11 pour l'homme). Ces cellules reconnaissent des antigènes glycolipidiques, présenté par le CD1d (Gapin, 2010). Elles sont impliquées dans l'inhibition de certaines pathologies auto-immunes

comme la polyarthrite rhumatoïde (Miellot et al., 2005), le lupus (Yang et al., 2012) et le diabète de type 1 (Lehuen et al., 1998).

III. Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ Foxp3⁺

A. Caractérisation

1. Caractérisation phénotypique

Il est maintenant clairement établi qu'il existe une population spécifique de LTs suppressifs capables d'inhiber très efficacement les réponses immunitaires. Pendant des dizaines d'années, ces cellules ont été étudiées, menant à la recherche de marqueurs permettant de les caractériser. L'existence de telles cellules a été suggérée dans le début des années 70 par Gershon et Kondo (Gershon and Kondo, 1970) (Gershon and Kondo, 1971) et très étudiées dans les années 80. Cependant, il n'avait pas identifié de marqueurs pour les caractériser. Puis en 1982, Shimon Sakaguchi a montré qu'une souris thymectomisée à l'âge de 3 jours développait un syndrome auto-immun (Sakaguchi et al., 1982b) et que les LTs étaient la cause de cette maladie (Sakaguchi et al., 1982a).

La poursuite de ses travaux l'a amené à démontrer que l'on pouvait prévenir la pathologie par un transfert de splénocytes ou de thymocytes syngéniques. De plus, il a identifié les splénocytes responsables comme étant CD5^{fort} CD8⁻ et a ainsi pu conclure que les cellules T suppressives, dans ce système, étaient des LTs CD4⁺. En 1985, il a mis au point un second modèle d'étude de la tolérance consistant à injecter des LTs CD4⁺ CD5^{faible} dans des souris athymiques. Ce protocole entraîne également de multiples pathologies auto-immunes et la co-injection de LT CD4⁺ CD5^{fort} permet d'empêcher le développement de ces pathologies (Sakaguchi et al., 1985). Quelques années plus tard, Fiona Powrie transféra des LT CD4⁺ CD45RB^{fort} dans des rats athymiques et observa que cela déclenchait une colite auto-immune. De la même façon que le Pr. Sakaguchi, elle observa que le co-transfert de LTs CD4⁺ CD45RB^{faible} prévenait l'apparition de la maladie (Powrie and Mason, 1990). Ces différentes études ont démontré qu'il existe une population de LT CD4⁺ supresseurs et que leur absence peut déclencher des pathologies auto-immunes. Toutefois, les marqueurs CD5 et CD45RB les caractérisant à l'époque sont également exprimés par une large fraction des LTconv, ce qui compliquait l'interprétation de ces résultats.

Le Pr. Sakaguchi a continué l'étude de ces LTs CD4⁺ supresseurs. En 1995, il a proposé la protéine CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) comme marqueur des Tregs. Les LTs CD4⁺

CD25⁺ représentent environ 10% des LT CD4⁺ périphériques dans les organes lymphoïdes chez la souris et la plupart de ces LTs sont CD5^{fort} et CD45RB^{faible}. Comme dans les études précédentes, l'injection de LTs CD4⁺ CD25⁻ dans une souris athymique déclenche une auto-immunité multiple qui peut être prévenue par la co-injection de LTs CD4⁺ CD25⁺. Ainsi, le marqueur CD25 semble être un bon marqueur des Tregs. Malgré le fait que les LTconvs expriment CD25 lors de leur activation, ils l'expriment à un niveau plus faible que les Tregs (Kuniyasu et al., 2000). D'autre part, l'expression de CD25 par les LTconvs activés est transitoire alors qu'elle est constitutive et stable chez les Tregs (Fisson et al., 2003). Depuis cette découverte, beaucoup d'équipes ont mené des études afin de mieux caractériser les Tregs CD4⁺ CD25⁺. Ainsi, l'équipe d'Ethan Shevach a été la première à démontrer le pouvoir suppresseur des Tregs CD4⁺ CD25⁺ *in vitro* : lorsque ces Tregs sont co-cultivés avec des LTconvs CD4⁺ CD25⁻ en présence d'anti-CD3, ils inhibent la prolifération des LTconvs et leur capacité à produire de l'IL-2 (Thornton and Shevach, 1998). Cette expérience est devenue le modèle *in vitro* classique pour tester les capacités suppressives des Tregs. Dorénavant j'utiliserais le terme Tregs pour parler des LTs CD4⁺ CD25⁺.

La découverte de CD25 comme marqueur des Tregs a permis une étude plus extensive de ces cellules et notamment la mise en évidence d'autres marqueurs exprimés par les Tregs. CTLA-4 est exprimé constitutivement par les Tregs et joue un rôle important dans leurs fonctions suppressives *in vitro* et *in vivo* (Read et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Wing et al., 2008). La protéine membranaire GITR a également été identifiée comme un marqueur des Tregs (Shimizu et al., 2002). Puis, au cours des années suivantes, d'autres marqueurs exprimés par les Tregs se sont ajoutés à la liste (Tableau 3). Néanmoins, les marqueurs CD25, CTLA-4 et GITR sont également exprimés par les LTconvs lors de leur activation. La quête d'un marqueur spécifique des Tregs permettant de les discriminer par rapport aux LTconvs n'était donc pas terminée.

Marqueurs	Commentaires	Références
CD103 ⁺	Définis les Tregs effecteurs/mémoires capable de produire de l'IL-10 et permet le "homing" des Tregs dans la peau et les muqueuses	(Lehmann et al., 2002) (Banz et al., 2003)
CCR6 ⁺	Définis les Tregs effecteurs/mémoires capable de produire de l'IL-10 avec un tropisme pour le colon	(Kleinewietfeld et al., 2005) (Kitamura et al., 2010)
CD127 ^{-/faible}	Les Tregs murins expriment faiblement le CD127 mais son expression est augmentée après activation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	(Cozzo et al., 2003) (Simonetta et al., 2010)
ICOS ⁺	Exprimé par la plupart des Tregs et définis les Tregs les plus suppressifs avec des caractéristiques Th1 et Th17	(Burmeister et al., 2008) (Vocanson et al., 2010)
LAG-3 ⁺	Exprimé par les Tregs activés et participe à leurs fonctions suppressives	(Huang et al., 2004)
CD39 ⁺	Constitutivement exprimé par les Tregs et participe à leur fonction suppressive	(Borsellino et al., 2007)
TNFR2 ⁺	Principalement exprimé par 30-40% des Tregs périphériques très suppressifs et environ 80% des Tregs thymiques.	(Chen et al., 2007b) (Chen et al., 2008b)

Tableau 3: Phénotype des Tregs. D'après (Chen and Oppenheim, 2011)

2. Foxp3 : le marqueur spécifique ?

Des avancées dans la génétique du syndrome IPEX (Immune Dyregulation, Polyendocrinopathy, X-linked syndrome) ont permis de mettre en évidence que les patients souffrant de cette pathologie auto-immune ont une mutation du gène *FOXP3* (Bennett et al., 2001). Toujours en 2001, cette observation a été confirmée chez la souris Scurfy qui est un modèle animal d'IPEX (Brunkow et al., 2001). Puis, la découverte du gène *Foxp3* a permis à deux groupes de démontrer que ce facteur de transcription est exprimé spécifiquement par les Tregs CD4⁺ CD25⁺ chez la souris (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Dans leurs études, les auteurs montrent que l'injection de Tregs CD4⁺ CD25⁺ guérit les souris déficientes pour l'expression de Foxp3 (*Foxp3*^{-/-}) de leur pathologie auto-immune. L'expression forcée de la protéine Foxp3 dans des LTconvs leur confère des fonctions suppressives *in vitro* et *in vivo*. Des LTconvs ainsi modifiés présentent alors beaucoup de caractéristiques des Tregs (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003).

Le problème majeur rencontré pour étudier les Tregs Foxp3⁺ est que Foxp3, en tant que facteur de transcription, est localisé dans le noyau. Il était impossible de purifier des Tregs « vivants » sur la base de ce nouveau marqueur. Ce problème a été résolu par le groupe

d'Alexander Rudensky qui a développé des souris transgéniques dans lesquelles l'expression de Foxp3 est corrélée à celle de la GFP (Green Fluorescent Protein) (Fontenot et al., 2005b). L'équipe de Richard Flavell a développé le même type de souris, mais cette fois, l'expression de Foxp3 est corrélée à celle de la RFP (Red Fluorescent Protein) (Wan and Flavell, 2005). Ces nouveaux outils ont permis de grandes avancées dans l'étude de la biologie des Tregs.

Entre autres, des études transcriptomiques ont été menées par plusieurs équipes pour établir la signature moléculaire des Tregs. Des Tregs triés sur la base de la GFP ou de l'expression de CD25 à partir de cellules déficientes ou non pour l'expression de Foxp3 ont été comparés à des LTconvs (Fontenot et al., 2005b; Hill et al., 2007). Ce qui ressort de ces études, c'est que la signature transcriptionnelle des Tregs n'est que partiellement dépendante de Foxp3. D'autre part, l'utilisation de souris où l'expression de Foxp3 est atténuée ou remplacée par la GFP a permis de démontrer que Foxp3, bien que participant au phénotype, aux fonctions et à l'homéostasie des Tregs (Gavin et al., 2007; Lin et al., 2007; Wan and Flavell, 2007), n'est pas le seul facteur responsable des caractéristiques spécifiques des Tregs.

D'autres études ont montré que la délétion de Foxp3 dans des LT CD4⁺ CD25⁻ ne change ni leur seuil d'activation, ni leur phénotype, ni leurs caractéristiques par rapport à des LTconvs sauvages (Hsieh et al., 2006). Il semble donc que la fonction de Foxp3 se limite aux Tregs. Une étude du groupe de Rudensky a permis de montrer que les Tregs Foxp3⁺ sont des cellules suppressives, qu'ils expriment CD25 ou non. Des études complémentaires sur le rôle de Foxp3 ont été menées grâce à l'utilisation de souris déficientes pour l'expression du gène *Foxp3* (Foxp3^{null}). Comme la souris Scurfy, les souris Foxp3^{null} développent des atteintes auto-immunes au niveau de plusieurs organes. L'injection de Tregs CD4⁺ CD25⁺ 2 jours après la naissance permet de prévenir l'apparition de ces pathologies (Fontenot et al., 2003). D'autres outils ont permis d'étudier l'impact des Tregs dans l'organisme. Notamment, les souris exprimant le récepteur à la toxine diphtérique (DTR) humaine sous le contrôle du promoteur du gène *Foxp3* (DEREG et Foxp3^{DTR}). Dans ces souris, toutes les cellules exprimant Foxp3 vont également exprimer le DTR. L'injection de la toxine diphtérique permettra la déplétion sélective et transitoire des cellules exprimant le facteur de transcription Foxp3. Ainsi, il a pu être démontré que ces souris développent le même type de syndrome auto-immun deux à trois semaines après ablation des Tregs Foxp3⁺ (Kim et al., 2007; Lahl et al., 2007).

Il est possible que d'autres populations cellulaires soient touchées par l'injection de la toxine diphtérique et que cela perturbe le développement et la fonction des Tregs, mais, il a été observé que la délétion du gène *Foxp3*, dans d'autres populations cellulaires comme les cellules de l'épithélium thymique, les DCs (Liston et al., 2007) ou encore les macrophages (Josefowicz et al., 2012a), ne modifiait pas le développement et la fonction des Tregs. Ces études renforcent la spécificité de *Foxp3* dans les Tregs. Toutefois, l'expression de *Foxp3* a pu être observée dans d'autres cellules immunitaires, notamment dans les iNKT murins et humains (Monteiro 2010 JI). Il a également été observé, une expression transitoire de *Foxp3* par les LTnaïfs lors de leur activation chez l'homme (Miyara et al., 2009) et chez la souris (Miyao et al., 2012).

L'ensemble des résultats obtenus à ce jour montre que les Tregs $CD4^+ Foxp3^+$ ont une importance fondamentale dans la tolérance périphérique et que *Foxp3* joue un rôle clé dans la biologie des Tregs. Néanmoins, *Foxp3* semble ne pas être l'unique acteur conférant aux Tregs leur rôle régulateur.

B. Ontogénie des Tregs $CD4^+ Foxp3^+$

Dans la littérature, sont décrits deux types de Tregs selon leur origine : les Tregs naturels (nTregs) qui ont pour origine le thymus et les Tregs dits induits (iTregs) qui se différencient en périphérie à partir de LTs $CD4^+$ naïfs.

1. Ontogénie des nTregs

L'idée d'une origine thymique des Tregs a été proposée suite aux expériences de thymectomie néo-natale du groupe de Shimon Sakaguchi. En effet, les souris thymectomisées à J3 développent un syndrome auto-immun du fait de l'absence de Tregs à la périphérie, ces derniers ne migrant à la périphérie qu'à partir de J4 (Asano et al., 1996). Mais, l'équipe d'Antonio Bandeira a démontré en 2004 que des nouveau-nés âgés de 3 jours possédaient, déjà à la périphérie des LTs $CD4^+ CD25^+$ exprimant faiblement le gène *Foxp3*. De plus, l'étude met en avant que des Tregs $CD4^+ CD25^+$ fonctionnels sont présents dans une souris adulte thymectomisée à J3 (Dujardin et al., 2004). Il semble donc, que dès le début de la production thymique chez le nouveau-né, il y ait apparition de Tregs qui migrent en périphérie. De nombreuses études ont été donc menées afin de mieux caractériser le développement thymique des nTregs. Plusieurs composantes importantes ont été mises en avant comme nécessaires à leur différenciation.

a) *Le signal TCR*

L'importance du signal TCR dans la différenciation des nTregs a été mise en évidence avec l'utilisation de souris transgéniques pour un TCR spécifique de la myéline et déficientes pour l'expression de la protéine RAG2. Ces souris TCR transgéniques RAG2^{KO} ne possèdent pas de Tregs. Elles développent des lésions inflammatoires au niveau du cerveau (modèle d'EAE), tandis que les souris exprimant la protéine RAG2, et de ce fait des TCRs endogènes, ne déclenchent pas la maladie (Lafaille et al., 1994; Olivares-Villagomez et al., 1998). Ces observations ont été confirmées par d'autres expériences : les thymocytes exprimant un TCR transgénique pour un ligand, exprimé dans le thymus grâce à un autre transgène, se différencient en Tregs Foxp3⁺, ou sont éliminés par sélection négative (Apostolou et al., 2002; Jordan et al., 2001). Ces résultats suggèrent fortement qu'une forte affinité du TCR pour le soi est nécessaire à la génération des Tregs dans le thymus (Figure 6).

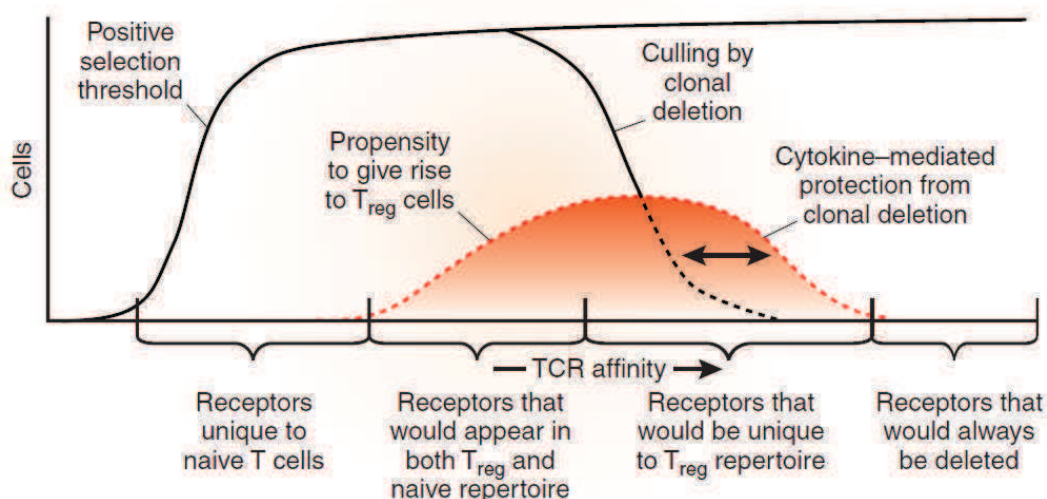


Figure 6 : Modèle d'affinité du TCR pour le développement des nTregs.

D'après (Hogquist and Moran, 2009)

L'utilisation de souris transgéniques exprimant une chaîne β du TCR invariante a permis d'observer la large diversité des chaînes α du TCR des Tregs et donc de leur répertoire. Seule une homologie partielle avec le répertoire des LTconvs a pu être notée (Hsieh et al., 2004; Wong et al., 2007). D'autre part, des LTconvs, transférés dans un hôte lymphopénique, exprimant un TCR transgénique issu de Tregs prolifèrent fortement et induisent une pathologie auto-immune. Ces derniers résultats peuvent indiquer que les LTconvs transgéniques ont été activés par des auto-antigènes en périphérie (Hsieh et al., 2004).

Une affinité intermédiaire à forte du TCR pour le soi semble donc indispensable au développement des nTregs. La quantité de l'antigène semble également jouer un rôle. En effet, il a été démontré que lorsqu'on diminuait l'expression de l'antigène ou bien l'expression des molécules du CMH de classe II par les mTECs, on favorisait l'apparition de nTreg (Hinterberger et al., 2010; Picca et al., 2009). Ainsi, une faible concentration d'antigène est suffisante pour le développement des Tregs sans déclencher la sélection négative. Il a également été démontré que pour une quantité importante d'antigènes, les nTregs, malgré leur meilleure résistance à la délétion clonale, finissent par être éliminés (Shih et al., 2004; van Santen et al., 2004). Les nTregs, bien que de forte affinité pour le soi, sont néanmoins soumis à la sélection négative. Ces études suggèrent donc qu'une quantité limitée d'antigène et une forte affinité pour les complexes pCMH du soi, sont deux conditions nécessaires pour la génération des nTregs.

Enfin, d'autres études ont mis en avant l'importance de la force du signal TCR dans la génération des Tregs. En particulier, le groupe de Kristin Hogquist a montré que l'expression de Nur77 était directement liée à l'intensité du signal TCR. L'expression de Nur77 est bien plus forte dans les thymocytes exprimant Foxp3 que dans les autres thymocytes (Moran et al., 2011).

En conclusion l'affinité du TCR pour le soi et l'intensité du signal TCR sont primordiales dans la différenciation des nTregs (Figure 7).

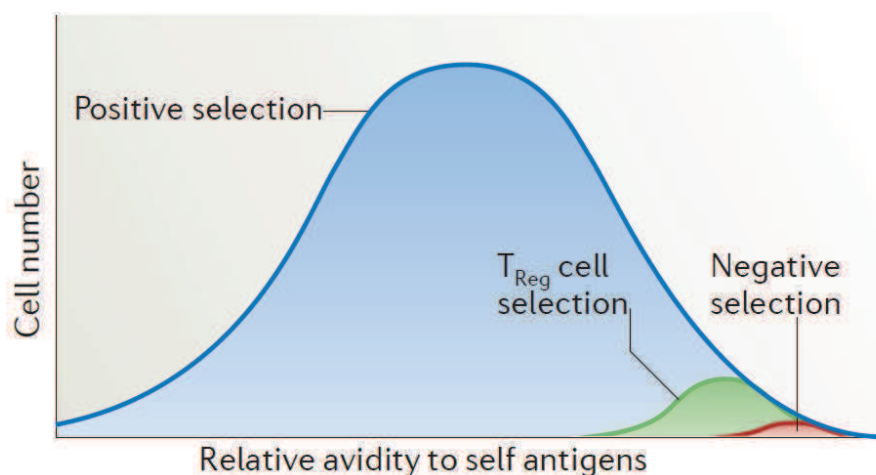


Figure 7 : Importance du signal TCR dans la différenciation des nTregs.
D'après (Hsieh et al., 2012)

b) Les signaux de co-stimulations

La molécule de co-stimulation CD28 a un rôle dans le développement des nTregs. En effet, les souris déficientes pour l'expression de la protéine CD28 (CD28^{KO}) présentent des proportions de Tregs thymiques et périphériques très faibles, voire nuls (Lohr et al., 2004; Salomon et al., 2000; Tang et al., 2003). Mais, très récemment une équipe a créé un modèle de souris *Foxp3^{YFP-Cre}CD28^{flox/flox}*, dans lequel seuls les Tregs sont déficients pour l'expression de la molécule CD28. Etonnamment, ces souris présentent un nombre normal de Tregs dans le thymus. Toutefois, elles développent une auto-immunité sévère due à un défaut de survie et de prolifération des Tregs en périphérie (Zhang et al., 2013). D'autres études récentes indiqueraient plutôt un rôle de CD28 dans la maturation lors du développement thymique des nTregs (Hinterberger et al., 2011), dans leur survie (Lio et al., 2010) et dans l'induction de Foxp3 via l'axe Lck (Tai et al., 2005).

Les interactions CD40-CD154 ont également un rôle dans l'expansion des nTregs dans la médulla thymique. En effet, les Tregs au cours de leur développement expriment la molécule CD154 qui interagit avec la protéine CD40 exprimée par les DCs et les mTEC. Ces interactions favorisent l'expansion des nTregs dans la médulla (Spence and Green, 2008). Chez l'homme, les interactions CD40-CD154, via les pDCs thymiques, seraient aussi impliquées dans le développement des nTregs (Martin-Gayo et al., 2010).

Plus récemment, une nouvelle voie de co-stimulation a été découverte pour la génération des nTregs. Cette étude révèle l'importance des interactions CD27-CD70 dans la régulation de l'apoptose des nTregs au cours de leur développement. En effet, l'interaction de la protéine CD27, présente à la surface des Tregs, avec la molécule CD70, exprimée par les mTECs et les DCs médullaires, induit des signaux de survie en inhibant les voies apoptotiques mitochondriales (Coquet et al., 2013).

Tous ces résultats révèlent que différentes voies de co-stimulations interviennent, à plusieurs niveaux importants, dans le développement des Tregs.

c) Le rôle de l'IL-2

Les autres signaux essentiels à la différenciation des nTregs sont apportés par les cytokines, notamment l'IL-2, et dans une moindre mesure l'IL-7 et l'IL-15. Le récepteur à l'IL-2 possède trois chaînes : α , β et γ respectivement nommées CD25, CD122 et CD132. La chaîne γ est commune aux récepteurs à ces 3 cytokines. Les souris déficientes pour l'IL-2

(IL-2^{KO}) ou déficientes pour CD25 (CD25^{KO}) ont environ 50% de nTregs en moins, tandis que l'absence des cytokines IL-7 ou IL-15 ne perturbe pas la génération des nTregs. En revanche, les souris déficientes pour la protéine CD132 (CD132^{KO}) ne possèdent plus de Tregs thymiques ou périphériques. Ces résultats suggèrent un rôle de l'IL-2 dans la différenciation thymique des nTregs (Burchill et al., 2007; Fontenot et al., 2005a; Vang et al., 2008).

Le signal TCR lors de la sélection positive induit une augmentation de l'expression du récepteur CD25. Les précurseurs des Tregs Foxp3⁻ CD25^{fort}, ainsi générés, deviennent sensibles à l'IL-2. La fixation de l'IL-2 à ses récepteurs active le facteur de transcription STAT5 qui, en se fixant au promoteur de *Foxp3*, va induire l'expression de celui-ci (Burchill et al., 2008; Chen et al., 2013a; Lio and Hsieh, 2008). Pris ensemble, ces résultats montrent que la signalisation de l'IL-2 joue un rôle important dans le développement des nTregs

Nous venons de voir que la différenciation thymique des Tregs nécessite plusieurs signaux simultanés et successifs : les signaux induits par l'activation du TCR, les molécules de co-stimulation et l'IL-2 (Figure 8). J'ai développé certains axes impliqués dans le développement des nTregs. D'autres facteurs entrent également en jeu dans la différenciation des nTregs, notamment la protéine AIRE et les différentes CPAs thymiques ainsi que d'autres facteurs moléculaires induisant Foxp3 (Figure 8).

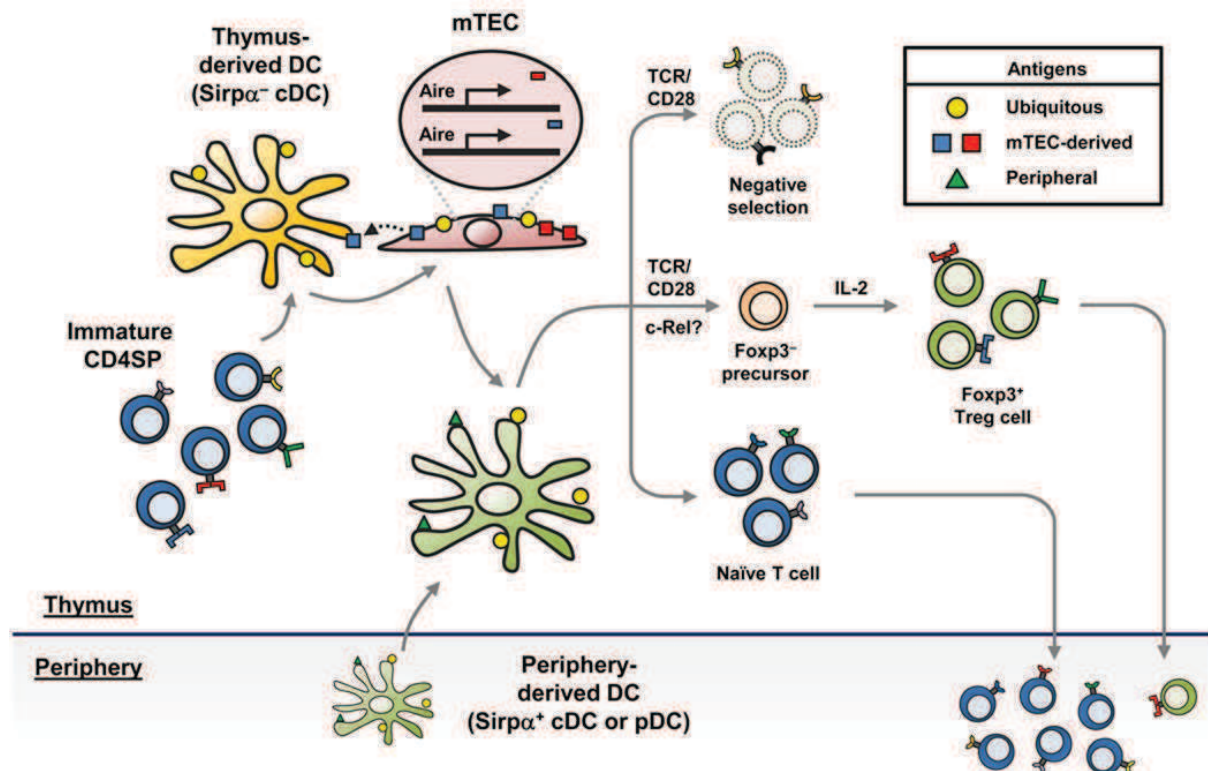


Figure 8 : Schéma de la différenciation thymique des nTregs.
Issu de (Lio and Hsieh, 2011)

d) Les CPAs thymiques et AIRE

Le signal TCR et les molécules de co-stimulation ont un rôle important dans la sélection thymique des nTregs. Le thymus contient un réseau complexe de CPAs qui interviennent à différents stades du développement des thymocytes, en général, et des Tregs, en particulier. Les premières études suggéraient que le développement des nTregs se déroulait dans le cortex (Bensinger et al., 2001). D'autres études ont renforcé cette idée en montrant que des cellules Foxp3⁺ ont été découvertes au stade DP (Fontenot et al., 2005b; Liston et al., 2008b; Wan and Flavell, 2005). Toutefois, cette population représente moins de 1% des Tregs thymiques, ce qui suggère une implication mineure des cTECs dans la génération des nTregs (Lee and Hsieh, 2009).

Les CPAs médullaires semblent avoir un rôle plus important dans la sélection des nTregs. Il a été démontré que la délétion spécifique des molécules du CMH de classe II dans les CPAs d'origines hématopoïétiques ou les mTECs n'impacte pas sur le nombre de Tregs générés (Aschenbrenner et al., 2007; Hinterberger et al., 2010). L'expression d'un antigène dans l'une ou l'autre de ces CPAs est suffisante pour sélectionner des Tregs spécifiques de cet antigène

(Apostolou et al., 2002; Aschenbrenner et al., 2007; Jordan et al., 2001). Ces résultats indiquent que les mTECs et DCs médullaires peuvent générer de façon indépendante des nTregs. De plus, deux études récentes ont renforcé l'importance des mTECs et, plus particulièrement, de la région médullaire dans la génération des nTregs.

Le groupe de Graham Anderson a évalué le rôle des mTECs dans le développement des LTconvs et des Tregs en greffant, dans une souris WT, un TOC (Thymus Organ culture) généré *in vitro* à partir d'embryons de souris *Relb*^{-/-}. Ce TOC est dépourvu de mTECs car RelB est un facteur de transcription nécessaire au développement de ces cellules. RelB étant aussi impliqué dans le développement des DCs, un rôle des DCs dans ce modèle ne peut être totalement exclu. Dans ces souris greffées, ils trouvent que le développement des thymocytes en LTnaïfs, après la sélection positive, n'est pas affecté. En revanche, malgré la présence de quelques DCs, le développement des précurseurs Foxp3⁻ CD25⁺ et des Tregs Foxp3⁺ CD25⁺ est fortement réduit (Cowan et al., 2013). La seconde étude montre qu'une absence d'interaction entre le CD27 et le CD70 entraîne une diminution du nombre de nTregs mais pas de celui des LTconvs. Cette étape interviendrait après l'induction de Foxp3 car la génération des précurseurs Foxp3⁻ n'est pas affectée. La protéine CD70 est exprimée par les mTECs et les DCs CD8α⁺ et la perte d'expression de cette molécule sur ces deux types cellulaires entraîne une forte diminution du développement des nTregs (Coquet et al., 2013). Les mTECs et les DCs jouent donc un rôle prépondérant dans le développement des Tregs.

Toutefois, il reste à déterminer dans quelle mesure les différentes CPAs agissent sur le répertoire des Tregs. En effet, les mTECs et les différentes DCs thymiques n'ont pas la même capacité d'expression, de capture et de présentation antigénique dans le thymus (Klein et al., 2009) (Figure 9). Les mTECs sont susceptibles de présenter les mêmes antigènes tissulaires périphériques que les DCs du fait qu'elles expriment le facteur de transcription AIRE (Mathis and Benoist, 2009; Nedic et al., 2008). Récemment, il a été démontré que le développement de Tregs spécifiques d'antigènes de la prostate était dépendant de l'expression d'AIRE. AIRE serait donc impliquée dans la génération de Tregs spécifiques d'antigènes du soi (Malchow et al., 2013).

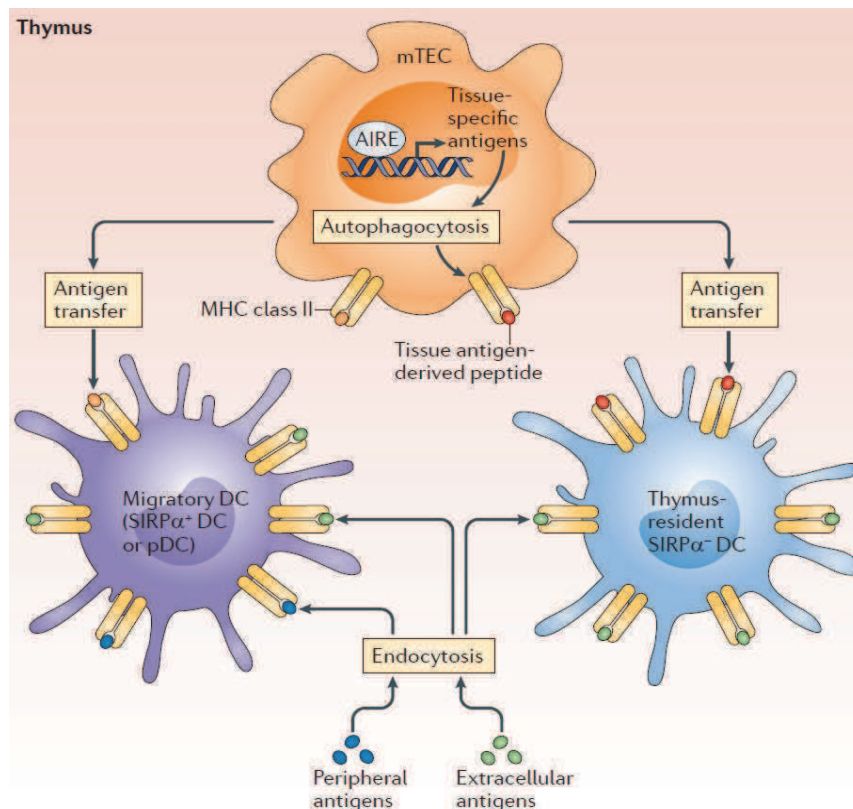


Figure 9 : Répertoire antigénique présenté par les CPAs médullaires.

D'après (Hsieh et al., 2012)

Une autre étude s'est penchée sur l'impact d'AIRE dans le développement du répertoire des Tregs. Les résultats de cette étude montrent que la présence ou l'absence d'AIRE ne modifie pas l'autoréactivité du répertoire TCR des Tregs (Daniely et al., 2010). Des études complémentaires sont nécessaires afin de décrypter l'impact de cette protéine dans la génération des nTregs.

e) Régulation de l'expression de Foxp3

L'expression de Foxp3 est indispensable pour avoir des Tregs fonctionnels en périphérie. Comme nous l'avons vu, le développement des nTregs est dicté par plusieurs mécanismes et certaines voies moléculaires sont indispensables à l'induction du gène *Foxp3*.

Le gène de *Foxp3* est situé sur le chromosome X chez l'homme et la souris. Il présente 4 régions importantes pour son expression : le promoteur et 3 régions non codantes conservées au cours de l'évolution, les CNS 1, 2 et 3 (Conserved Non-coding Sequences). Ces 3 séquences non codantes participent à la régulation de l'expression de Foxp3 mais, de façons différentes. Le CNS1 est impliqué dans la différenciation en iTregs, le CNS2 ou TSDR (Treg

Specific Demethylated Region) est relié à la stabilité de l'expression de *Foxp3* et le CNS3 est la région initiatrice du processus de différenciation thymique des Tregs.

Les aspects épigénétiques de ces régions sont importants pour la régulation de la transcription du gène *Foxp3* (Huehn et al., 2009). La méthylation et l'acétylation des histones ou la méthylation des motifs CpG sont les principaux mécanismes d'épigénétiques qui ont un rôle critique dans le contrôle de l'expression des gènes. Dans les Tregs matures, le promoteur de *Foxp3* est largement déméthylé au niveau des îlots CpG et les histones associées sont fortement acétylées (Kim and Leonard, 2007). Cette configuration « ouverte » de la chromatine permet l'accès des facteurs de transcription AP1, NFAT, NF- κ B, STAT5 et Runx. Dans un thymocyte CD4SP immature ou dans les LTconvs périphériques le promoteur et le CNS2 sont fortement méthylés : la chromatine a donc une conformation « fermée ». Une étude récente a montré que, dans ces cellules, la ligase PIAS1 occupe le promoteur et recrute des DNA méthyl transférase ainsi que la protéine HP1 (Heterochromatin protein 1) pour maintenir l'état « fermé » de la chromatine et empêcher l'expression de *Foxp3*. En concordance avec ces résultats, il a été observé que les souris PIAS1^{-/-} possède un nombre plus élevé de Tregs (Liu et al., 2010). Le CNS2 est totalement déméthylé au niveau des îlots CpG dans les Tregs périphériques tandis que dans les LTconvs et les thymocytes DP il est fortement méthylé (Floess et al., 2007). Dans ce cas, le mécanisme impliqué ne requiert pas PIAS1 (Toker and Huehn, 2011). Le CNS2 est principalement important pour le maintien d'une expression stable de *Foxp3* et, est peu impliqué dans l'induction de l'expression de *Foxp3* dans le thymus. En effet, cette région n'est que partiellement déméthylée dans les cellules CD4 SP *Foxp3*⁺ (Floess et al., 2007) et lorsque cette région est délétée, la stabilité des Tregs est affectée mais pas leur génération dans le thymus (Zheng et al., 2010). En somme, beaucoup de résultats montrent que des événements épigénétiques au niveau du promoteur de *Foxp3* sont indispensables pour permettre aux facteurs moléculaires d'induire la transcription de *Foxp3*.

Comme nous l'avons vu précédemment, il y a 3 grandes voies de signalisation pouvant induire *Foxp3* dans le thymus : les voies d'activation du TCR et de CD28 ainsi que les voies de signalisation induites par les cytokines IL-2. Le rôle du TGF- β dans la différenciation thymique est encore débattu, alors qu'il joue un rôle important dans la différenciation des iTregs (Figure 10).

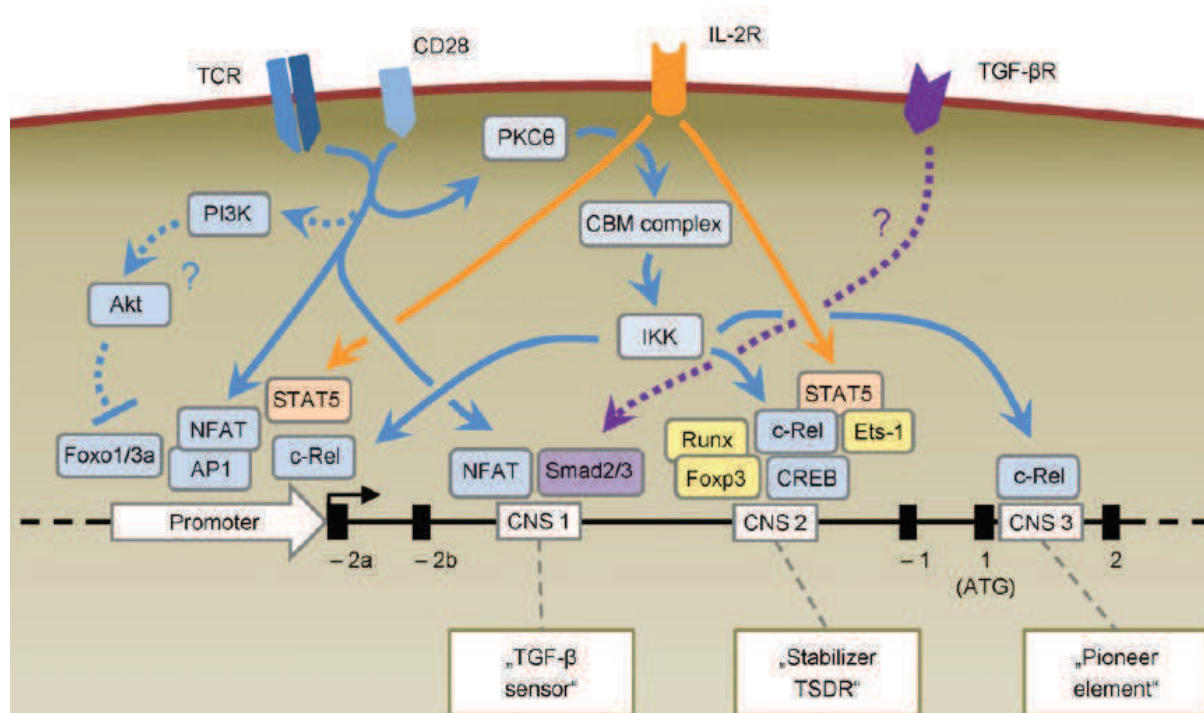


Figure 10 : Voies d'induction de Foxp3 dans le développement des Tregs.

Issu de (Klein and Jovanovic, 2011).

De façon cohérente avec l'importance du TCR et de CD28 dans la différenciation des Tregs, les facteurs de transcription en aval de ces molécules, notamment NFAT, NF-κB et AP-1, ont été impliqués dans le contrôle de la différenciation des Tregs. En effet, NFAT et AP-1 se lient au promoteur de FOXP3 pour réguler l'activité du promoteur chez l'homme (Mantel et al., 2006). Les deux facteurs de transcription Foxo1 et Foxo3, en se fixant à la région promotrice de *Foxp3* et au CNS2 induisent également l'expression de Foxp3. De plus, leur absence combinée entraîne une très forte diminution du développement des nTregs (Kerdiles et al., 2010; Ouyang et al., 2010).

Les signaux TCR/CD28 sont très importants pour l'initiation et l'induction du gène *Foxp3*. Lorsque les gènes impliqués dans la voie de signalisation induite par le TCR et CD28 et conduisant à l'activation de NF-κB sont déficients, on a un profond déficit de différenciation thymique des Tregs. Ainsi, des mutations ou délétion de PKCθ (Gupta et al., 2008), CARMA1 et Bcl10, entraînent un défaut dans la génération des nTregs. En particulier, les souris CARMA1^{KO} et Bcl10^{KO} ne possèdent pas du tout de Tregs (Barnes et al., 2009; Medoff et al., 2009; Molinero et al., 2009; Schmidt-Supprian et al., 2004). Parmi les différents membres de NF-κB il a été surtout démontré que la sous-unité c-Rel joue un

rôle critique dans l'induction de *Foxp3* (Isomura et al., 2009; Ruan et al., 2009). En effet, c-Rel se fixe au promoteur (Long et al., 2009), au CNS2 (Isomura et al., 2009), et principalement au CNS3 (Zheng et al., 2010). Il a été montré par le groupe de Rudensky que le CNS3 et c-Rel sont très fortement liés dans l'induction de *Foxp3* dans le thymus. En effet, des résultats très comparables sont obtenus dans les chimères mixtes WT/CNS3^{-/-} ou WT/c-Rel^{-/-} (Zheng et al., 2010). Cela indique une forte corrélation entre le CNS3 et c-Rel, malgré le fait que le mécanisme moléculaire reste à déterminer. Cependant, il serait possible que, suite à l'activation de la molécule CD28, c-Rel, en se fixant au CNS3, initie le remodelage de la chromatine comme il le fait au niveau du locus de l'IL-2 (Rao et al., 2003). Une autre possibilité est que c-Rel en se fixant au CNS3 formerait un « enhanceosome » composé entre autres de NFAT, Smad et CREB qui se fixeraient au promoteur de *Foxp3* et induiraient sa transcription (Ruan et al., 2009). L'ensemble de ces résultats montrent que l'engagement du TCR et celui de CD28 initient des voies de signalisation majeures pour l'expression de *Foxp3* lors de la différenciation des iTregs.

2. Ontogénie des iTregs

a) *Mise en évidence*

Les iTregs ont été mis en évidence pour la première fois par le groupe de J.Lafaille en 2002 dans un modèle d'EAE (Furtado et al., 2002). Par la suite, de nombreuses études ont permis de les caractériser. Notamment dans des modèles de tolérance orale par l'administration de faibles concentrations d'antigènes (Coombes et al., 2007; Mucida et al., 2005). Il a récemment été démontré que la génération préférentielle de Tregs spécifiques d'antigènes de la flore commensale à la périphérie prévaut à la génération de LTs CD4⁺ effecteurs pathogéniques. Ces résultats soulignent l'importance d'une éducation post-thymique du système immunitaire aux antigènes étrangers (Lathrop et al., 2011). Les iTregs participent à la tolérance immunitaire mais, peuvent être potentiellement néfastes dans les réponses anti-bactériennes et anti-virales ainsi que dans les réponses anti-tumorales (Liu et al., 2007; Nishikawa et al., 2003). La génération d'iTregs se fait dans différents contextes environnementaux et expérimentaux et leur spécificité antigénique est dirigée contre des antigènes du non-soi ou du soi (Bilate and Lafaille, 2012).

b) *Mécanismes de différenciation des iTregs*

La génération d'iTregs nécessite l'activation du TCR. Une étude a analysé le répertoire TCR des LTs *Foxp3*⁺ générés après le transfert adoptif de LTs CD4⁺ *Foxp3*⁻ dans un hôte

lymphopénique. Puis, il a été comparé à celui des Tregs Foxp3⁺ d'une souris non manipulée. Les résultats montrent qu'il y a peu de chevauchement entre le répertoire des iTregs ainsi générés et celui des Tregs d'une souris non manipulée (Lathrop et al., 2008). De récentes études ont démontré que les TCRs exprimés par les Tregs issus de l'intestin se distinguent des TCRs exprimés par les Tregs provenant des autres tissus ou encore des ganglions lymphatiques, et que leurs TCRs reconnaissent des antigènes dérivés de la flore commensale (Lathrop et al., 2011).

L'affinité du TCR pour son ligand joue également un rôle dans l'induction d'iTregs. Ceci a été suggéré par le groupe de James Allison lorsqu'en 2010 il a utilisé des peptides antigéniques de faible ou forte affinité pour un même TCR, et n'observe pas la même efficacité d'induction de Foxp3. En effet, les peptides de haute affinité génèrent plus efficacement des iTregs Foxp3⁺ par rapport aux peptides de faible affinité (Gottschalk et al., 2010). Au sein de notre équipe, nous avons récemment démontré que les LTnaïfs les plus affins pour le soi se différenciaient plus efficacement en iTregs *in vitro* et *in vivo* (Martin et al., 2013) que les LTnaïfs les moins auto-réactifs. Tous ces travaux font ressortir le rôle essentiel du signal TCR dans la différenciation des iTregs.

En plus du signal TCR, l'induction de l'expression de Foxp3 dans les LTnaïfs périphériques est facilitée par la présence de TGF- β (Chen et al., 2003; Selvaraj and Geiger, 2007; Zheng et al., 2004b). L'IL-2, en complément du TGF- β , est également requis pour l'induction de Foxp3 dans les LTs périphériques *in vitro* (Davidson and Shevach, 2011). De manière intéressante, l'IL-2 va limiter la génération de LTs Th17 en présence de TGF- β et va promouvoir, via STAT-5, la survie et la division cellulaire des iTregs (Laurence et al., 2007). Enfin, le TGF- β , en plus d'induire l'expression de Foxp3, réprime le facteur de transcription Gfi-1, qui inhibe la différenciation des LTnaïfs périphériques en iTregs et en LTs Th17 (Zhu et al., 2009).

Le signal TGF- β , associé au signal TCR, permet la différenciation en iTregs grâce à la formation du complexe Smad2-3/NFAT, qui se fixe sur le CNS1 du gène *Foxp3* (Tone et al., 2008) (Zheng et al., 2010). Le CNS1 joue principalement un rôle dans la différenciation en iTregs mais peu dans la différenciation thymique des Tregs (Zheng et al., 2010). Le rôle du CNS1 dans la différenciation en iTregs a été renforcé par deux études récentes du groupe de Rudensky. La première montre d'une part que les LTnaïfs délétés de la région du CNS1 se différencient très faiblement en iTregs *in vitro* et, d'autre part, que l'absence du CNS1

entraîne un défaut de génération d'iTregs nécessaires à la prévention de l'inflammation des muqueuses intestinales et pulmonaires (Josefowicz et al., 2012b). La seconde, démontre que des femelles gestantes déficientes pour la région CNS1 présentent une diminution du nombre de fœtus due à la très faible induction d'iTregs spécifiques d'antigènes paternels (Samstein et al., 2012).

Une autre molécule intervenant dans la génération des iTregs est l'acide rétinoïque. Son implication a été démontré par l'équipe de Yasmine Belkaid dans la lamina propria de l'intestin grêle où les DCs CD103⁺, productrices d'acide rétinoïque, favorisent la génération d'iTregs (Sun et al., 2007). L'acide rétinoïque va induire la fixation de son récepteur RXR au CNS1 et activer l'expression de *Foxp3* (Xu et al., 2010).

Les DCs sont également capables d'induire des iTregs via la production d'IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase). En effet, l'IDO catalyse la dégradation du tryptophane en kynurénines qui en se fixant sur le récepteur AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) favorise la génération d'iTregs tout en inhibant la différenciation Th1 et Th17 (Chen et al., 2008a; Mezrich et al., 2010).

Nous venons de voir les mécanismes permettant la différenciation de thymocytes immatures ou de LTnaïfs périphériques respectivement en nTregs et iTregs. Une fois que les nTregs quittent le thymus, ils migrent à la périphérie où ils exercent leur pouvoir suppressif. Les Tregs possèdent un véritable arsenal de mécanismes de suppression qu'ils utilisent contre plusieurs types cellulaires afin de contrôler les réponses immunitaires.

C. Les fonctions suppressives des Tregs

1. Mécanismes effecteurs des Tregs

a) Les cytokines immunosuppressives

➤ L'IL-10

L'IL-10 est une molécule anti-inflammatoire sécrétée par plusieurs types cellulaires comme les DCs, les LB, les LTconv, les Tregs etc... Les souris IL-10^{KO} développent une forte inflammation au niveau intestinal. Il a également été démontré un rôle important de l'IL-10 dans la prévention d'autres pathologies comme les infections mycobactériennes (Kursar et al., 2007). ou le rejet de greffe (Molitor-Dart et al., 2007). L'IL-10 est l'une des premières cytokines découverte comme impliquée dans les fonctions suppressives des Tregs. En effet,

c'est en 1999 que le groupe de Fiona Powrie met en évidence le rôle de l'IL-10 produite par les Tregs dans le contrôle de l'IBD (Inflammatory Bowel Disease) induite par le transfert de LT CD4⁺ naïfs dans des hôtes immuno-déficients (Asseman et al., 1999). Contrairement à l'injection de Tregs issus d'une souris WT, l'injection de Tregs provenant de souris IL-10^{KO} ne permet pas de contrôler la pathologie (Asseman et al., 1999). Plus récemment, l'équipe de Rudensky a réellement démontré le rôle de l'IL-10 secrétée par les Tregs en utilisant des souris conditionnelles où l'ablation de l'IL-10 est spécifique aux Tregs. Ces souris ne développent pas d'auto-immunité systémique mais une IBD, une hyper-sensibilité cutanée et une forte inflammation des voies pulmonaires (Rubtsov et al., 2010). Bien qu'il ait été démontré que les Tregs produisent de l'IL-10 *in vitro* en présence d'IL-2 (de la Rosa et al., 2004), elle n'est pas impliquée dans la régulation *in vitro* de la prolifération des LTconvs (Shevach, 2006).

Ces résultats indiquent que l'IL-10 produite par les Tregs est importante pour la régulation immunitaire dans les muqueuses.

➤ Le TGF-β

Le TGF-β est une cytokine immunosuppressive à effet pléiotropique. Les souris déficientes en TGF-β ou pour son récepteur développent un syndrome lymphoprolifératif similaire aux souris Foxp3^{null} (Marie et al., 2006; Shull et al., 1992). Le TGF-β membranaire peut être exprimé à la surface des Tregs et participe à leur fonction suppressive *in vitro* (Nakamura et al., 2001). En particulier, les Tregs activés expriment le complexe LAP/TGF-β et peuvent directement participer à la conversion de LTconvs en iTregs (Anderson et al., 2008). Le TGF-β induit aussi l'expression d'IDO dans les DCs augmentant ainsi, via une autre voie, la conversion de LTconvs en iTregs (Pallotta et al., 2011). Enfin, le TGF-β joue un rôle important dans l'induction et le maintien de l'expression de Foxp3 *in vivo* et *in vitro* dans les nTregs et les iTregs (Chen et al., 2003; Li et al., 2006).

L'ensemble de ces résultats révèle un rôle direct et indirect du TGF-β produit par les Tregs dans l'immunosuppression.

➤ L'IL-35

L'IL-35 est une cytokine découverte très récemment par l'équipe de Dario Vignali. Elle est composée de la chaîne α de l'IL-12 appelée p35 et de la chaîne β de l'IL-27 appelée Ebi3 (Epstein-Barr virus-induced gene 3). Cette cytokine participe aux fonctions suppressives des

Tregs *in vitro* et *in vivo* (Collison et al., 2007). De manière intéressante, les Tregs producteurs d'IL-35 interagissent par contacts avec leurs cibles (Collison et al., 2009) et induisent des iTregs, n'exprimant pas Foxp3, appelés « Tr35 ». Les Tr35 sont également de forts producteurs d'IL-35 et possèdent des fonctions suppressives (Collison et al., 2010). Toutefois, les Tregs déficients pour p35 ou Ebi3 ne sont que légèrement moins fonctionnels *in vitro* que des Tregs « sauvages ». De même, les souris déficientes pour Ebi3 ne développent pas de syndrome auto-immun (Collison et al., 2007). Des études complémentaires seraient donc nécessaires afin de mieux caractériser le rôle de cette cytokine dans la fonction des Tregs.

Les cytokines produites par les Tregs sont anti-inflammatoires et immunosuppressives, et l'expression de ces molécules augmente lors de l'activation des Tregs. En effet, les Tregs fortement activés vont être plus suppresseurs, phénomène amplifié par une boucle de régulation positive via l'expression accrue de l'IL-10, du TGF- β et de l'IL-35. Dans un même temps, ils vont également induire la différenciation des Tconv en iTregs, Tr1 et Tr35, sécrétant à leur tour des cytokines immunosuppressives (Figure 11).

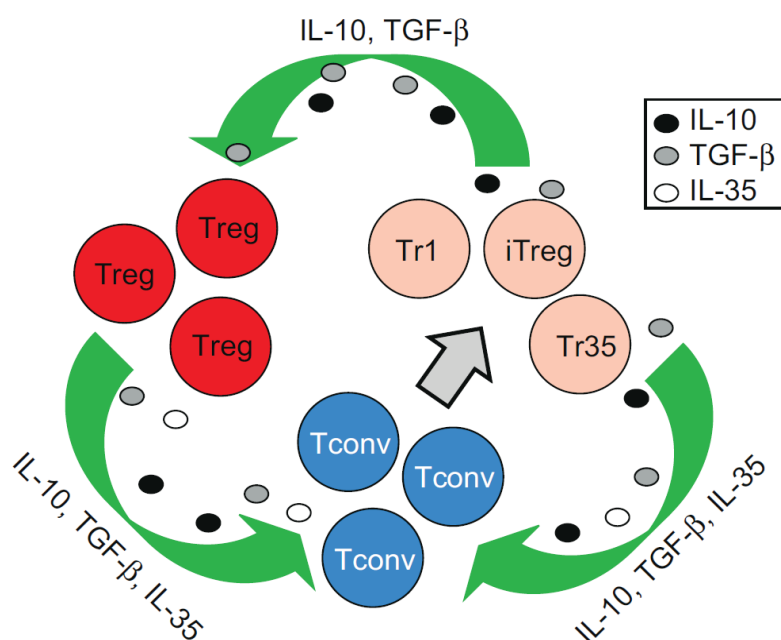


Figure 11 : Boucles d'action des cytokines immunosuppressives produites par les Tregs.
Issu des (Yamaguchi et al., 2011)

b) La cytolyse

Les Tregs peuvent produire ou exprimer à leur surface d'autres molécules suppressives entraînant la mort des cellules cibles. La molécule principale utilisée par les Tregs pour induire la cytolyse est l'utilisation des molécules de Granzyme B (GrzmB). Il a été démontré

que la voie perforine/granzyme était directement utilisée par les Tregs pour lyser leurs cibles (Cao et al., 2007). De plus, l'équipe de Sebastian Amigorena a démontré *in vivo*, dans un contexte tumoral, que les Tregs tuent les DCs présentes dans la tumeur et dans les ganglions drainants via la voie perforine/granzyme (Boissonnas et al., 2010).

La galectine-1 (Gal-1) est une autre molécule utilisée par les Tregs qui lorsqu'elle se fixe à ses ligands CD45, CD43 et CD7, induit l'apoptose des cellules et les Tregs issus des souris Galectine-1^{KO} sont moins suppresseurs *in vitro* (Garin et al., 2007).

Enfin, les Tregs expriment TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis Induced Ligand) et Fas-L après activation et peuvent ainsi induire l'apoptose de leur cellules cibles (Ren et al., 2007; Strauss et al., 2009).

c) Les altérations métaboliques

Les Tregs peuvent agir sur certaines voies métaboliques des LTconvs et ainsi inhiber leurs fonctions ou encore induire leur apoptose (Figure 12).

➤ Les ectoenzymes : CD39 et CD73

Les Tregs expriment différents marqueurs à leur surface et certaines protéines permettant de les identifier sont souvent reliées à leur fonction suppressive. C'est le cas des deux ectoenzymes CD39 et CD73, exprimées préférentiellement sur les Tregs, qui catalysent l'ATP en adénosine. L'enzyme CD39 transforme l'ATP en AMP et l'enzyme CD73 transforme l'AMP en adénosine. L'adénosine produite va se fixer sur le récepteur A2A exprimé par les LTconvs pour inhiber leur activation et leur prolifération *in vitro* et *in vivo* (Deaglio et al., 2007).

➤ L'AMP cyclique (AMPc)

Les Tregs peuvent agir de manière différente via le métabolisme de l'adénosine. En effet, ils possèdent une forte concentration d'AMPc intracytoplasmique grâce, notamment, à la répression de l'expression du gène *Pde3b* codant pour la phosphodiesterase PDE3B qui dégrade l'AMPc (Gavin 2007 Nature). Les Tregs sont, en outre, capables de transférer de l'AMPc dans le cytoplasme des LTconvs via des jonctions GAP, ce qui induit une accumulation d'ICER (Inducible cAMP early repressor) dans le noyau (Vaeth et al., 2011) des LTconvs et par conséquent réduit leur prolifération et leur synthèse d'IL-2 (Bopp et al., 2007).

➤ La consommation d'IL-2

Les Tregs expriment fortement le CD25 mais ne produisent pas d'IL-2. Cela les rend dépendants de l'IL-2 produite par les LTconvs (Almeida 2002 JI). La consommation d'IL-2 est très importante pour les Tregs car cette cytokine leur permet de proliférer, de survivre et de fonctionner. Du fait de leur forte consommation d'IL-2, les Tregs peuvent priver les LTconvs de l'IL-2 environnante. Les LTconvs privés d'IL-2 expriment Bim et rentrent en apoptose (Pandiyani et al., 2007). De la même façon, il a été très récemment démontré que les Tregs perturbent l'activité des lymphocytes NK en consommant l'IL-2 environnante (Gasteiger et al., 2013b).

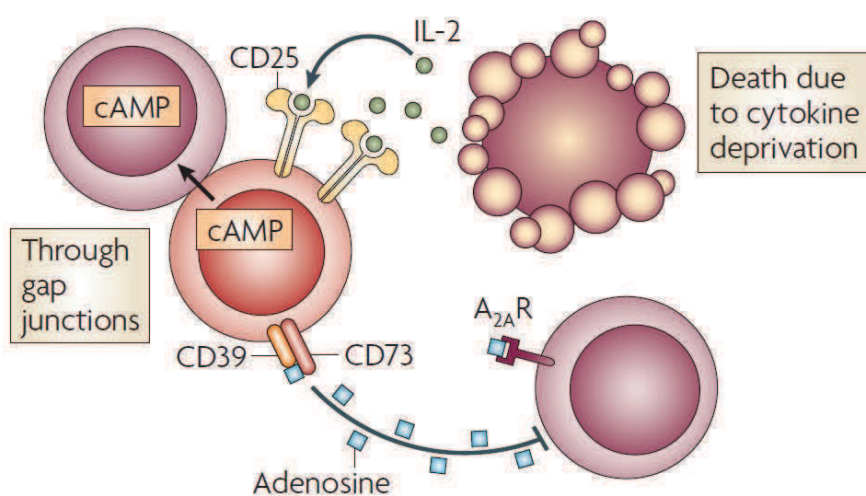


Figure 12 : Mécanismes des altérations métaboliques causées par les Tregs.
Issu de (Vignali et al., 2008).

d) La modulation des cellules dendritiques

Les Tregs peuvent moduler l'activation et le phénotype des DCs. En particulier, ils diminuent les capacités de co-stimulation des DCs à la fois *in vitro* (Cederbom et al., 2000) et *in vivo* (Wing et al., 2008). Les Tregs expriment fortement CTLA-4 qui se fixe comme CD28 sur les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, entraînant la diminution de leur expression à la surface des DCs. En effet, il a été montré que les Tregs sont capables d'arracher par trans-endocytose les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 exprimé par les DCs grâce à CTLA-4. Ce phénomène diminue l'expression de CD80 et CD86 à la surface des DCs et diminue ainsi leur capacité de co-stimulation (Qureshi et al., 2011). De plus, il a été démontré que les Tregs formaient des agrégats avec les DCs grâce à CTLA-4 et la molécule d'adhésion LFA-1 (CD11a), inhibant ainsi leur maturation *in vitro* (Onishi et al., 2008).

Lorsqu'ils sont activés, les Tregs expriment également la molécule LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene-3), qui est une molécule homologue au co-récepteur CD4. LAG-3 se fixe aux molécules du CMH de classe II avec une forte affinité, augmentant le temps d'interaction entre DCs et Tregs (Huang et al., 2004), ce qui permet d'inhiber les DCs (Liang et al., 2008). Dans un même registre, les Tregs expriment fortement la neuropilin-1 (Nrp-1). La Nrp-1, en se liant au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et aux sémaphorines de classe 3, permet également d'augmenter les interactions entre DCs et Tregs entraînant ainsi une diminution de la capacité de présentation antigénique des DCs (Sarris et al., 2008).

Nous venons ainsi de passer en revue les principaux mécanismes de suppression décrits par les Tregs (Figure 13). Il est probable que le type de mécanisme utilisé par les Tregs dépend de l'environnement où ils se situent et des cibles cellulaires à inhiber.

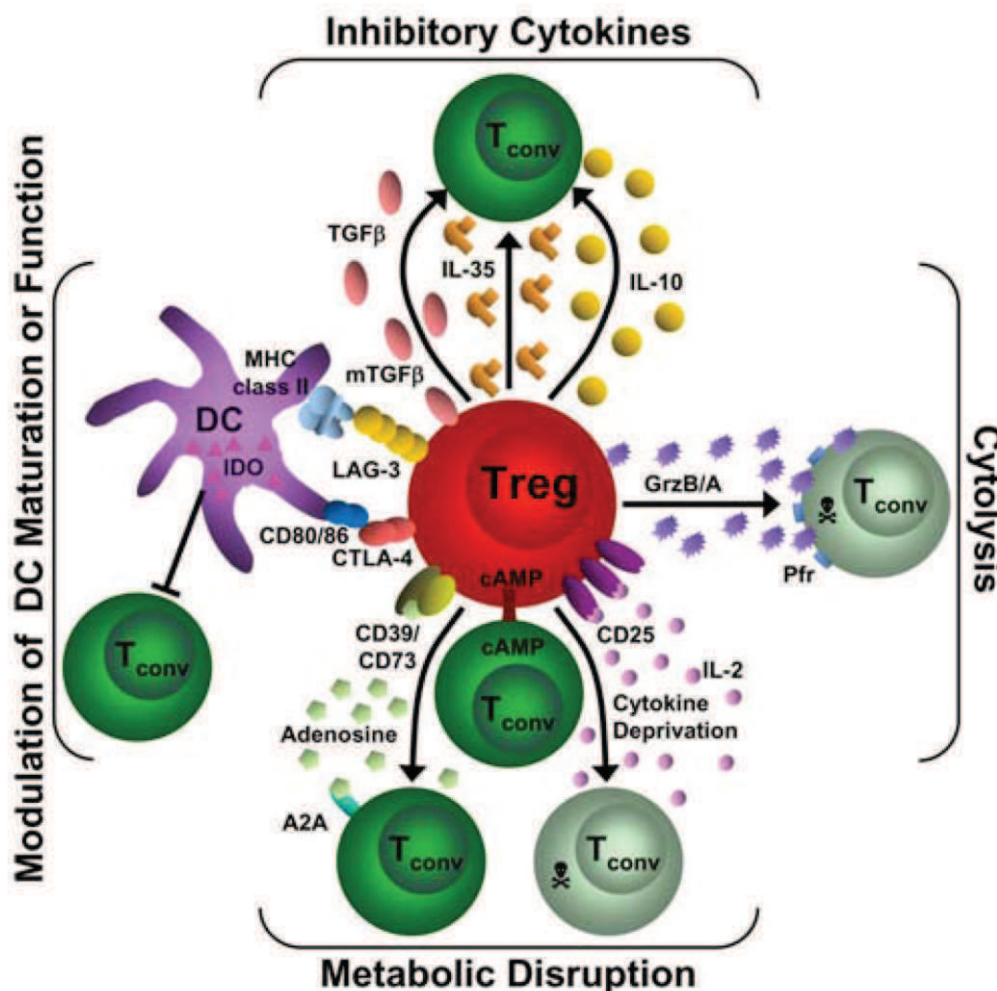


Figure 13 : L'arsenal de suppression des Tregs.
Issu de (Workman et al., 2009)

2. Les Tregs : des cellules régulatrices professionnelles

a) *Les cellules immunitaires ciblées par les Tregs*

Les Tregs ont la capacité d'inhiber plusieurs populations du système immunitaire (Tableau 4).

Cibles	Mécanismes décrits	Références
LTconvs	Tout mécanisme	cf paragraphe C.1
LBs	Perforine /granzyme	(Zhao et al., 2006)
NK	TGF- β , consommation d'IL-2	(Ghiringhelli et al., 2005) (Gasteiger et al., 2013b)
NKT	Contacts cellulaires	(Azuma et al., 2003)
Macrophages	TGF- β	(Tonkin and Haskins, 2009)
DCs	cf paragraphe C.1.d	cf paragraphe C.1.d
Monocytes	IL-10	(Pommier et al., 2013)

Tableau 4 : Cibles des Tregs

b) *Les Tregs dans la réponse CD8*

Les études *in vitro* ont montré que les Tregs inhibaient la prolifération et la production d'IFN- γ lors de l'activation des LTs CD8⁺ naïfs (Piccirillo and Shevach, 2001). *In vivo*, il a été démontré que les Tregs régulaient la réponse primaire et la réponse mémoires des LTs CD8⁺ (Chappert et al., 2010; Suvas et al., 2003).

Des études très récentes ont souligné l'importance des Tregs dans les réponses CD8 et plus particulièrement lors de leur activation et de la génération des LTs mémoires CD8⁺. Dans ces expériences, la déplétion des Tregs grâce à l'utilisation des souris Foxp3^{DTR} (DEREG) entraîne une expansion plus forte des LTs CD8⁺ au début de la réponse primaire mais, uniquement si les Tregs sont déplétés avant le pic de l'expansion (de Goer de Herve et al., 2012). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude utilisant un système similaire. En effet, l'équipe du Sebastian Amigorena a aussi développé un système utilisant les souris DEREG afin d'observer le rôle des Tregs dans le « priming » des LTs CD8⁺. Dans ces expériences, les souris DEREG sont injectées avec des DCs traitées au LPS et chargées en peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL, N4). Puis, les souris sont traitées à la DT 3, 4, 9 et 10 jours après l'injection des DCs. Les résultats montrent que la délétion des Tregs augmente l'activation et l'expansion des LTs CD8⁺ de faible avidité pour l'antigène (Pace et al., 2012).

Les Tregs limitent également la production des chimiokines CCL3/4 par les DCs (Morlacchi et al., 2011). Cette famille de chimiokines est impliquée dans le contrôle du « priming » des

LTs (Castellino et al., 2006; Hickman et al., 2011; Hugues et al., 2007) et dans la stabilisation des synapses DCs-LTs (Contento et al., 2008; Molon et al., 2005). Lorsque ces deux chimiokines sont bloquées, l'effet de la déplétion des Tregs sur l'activation des LTs CD8⁺ n'est plus retrouvé. Les Tregs limitent donc l'activation des LTs CD8⁺ de faible avidité en inhibant la production de CCL-3/4 par les DCs.

Ces travaux montrent également que les Tregs aident à la génération de LTs CD8⁺ mémoires fonctionnels, en limitant l'accès à l'IL-2 aux précurseurs des LTs CD8⁺ mémoires (de Goer de Herve et al., 2012).

Les Tregs ont un rôle essentiel dans l'initiation d'une réponse CD8 efficace et dans la génération de LTs CD8⁺ mémoires fonctionnels. Il est important de souligner que les Tregs sont cruciaux dans la prévention de pathologie auto-immune CD8 (Poitrasson-Riviere et al., 2008) et limitent les réponses CD8 mémoires afin de protéger l'intégrité de l'organisme (Brincks et al., 2013).

c) Les Tregs inhibent différentes classes de réponses immunes

Il est maintenant connu que l'environnement cytokinique a un impact sur la différenciation des LTnaïfs (Zhu et al., 2010). L'IFN- γ et l'IL-12 les différencient en LTs Th1, importants pour la lutte contre les pathogènes intracellulaires. L'IL-4 permet leur différenciation en LTs Th2, importants contre les parasites extracellulaires et l'IL-6 accompagnée du TGF- β , oriente les LTnaïfs vers une réponse Th17 qui permet de combattre efficacement les champignons, les levures et les bactéries extracellulaires. Plus récemment, il a été décrit un nouveau type de LTs « helper », les LTs folliculaires (Tfh), qui sont essentiels dans les centres germinatifs pour la différenciation des LB en plasmocytes. Les études récentes ont démontré que l'environnement cytokinique impactant sur la différenciation des LTs joue également un rôle dans la spécialisation des Tregs (Figure 14).

IRF4 (Interferon regulatory factor 4) est le facteur de transcription nécessaire à la différenciation des LTs Th2. Il a été démontré qu'IRF4, en interagissant avec Foxp3, contrôle l'expression d'un panel de gènes dans les Tregs leur permettant de contrôler les réponses immunitaires de type Th2. En effet, l'ablation spécifique d'IRF4 dans les Tregs entraîne une augmentation de la production des cytokines produites par les LTs Th2, induisant ainsi une réponse immunitaire pathologique contre l'organisme (Zheng et al., 2009).

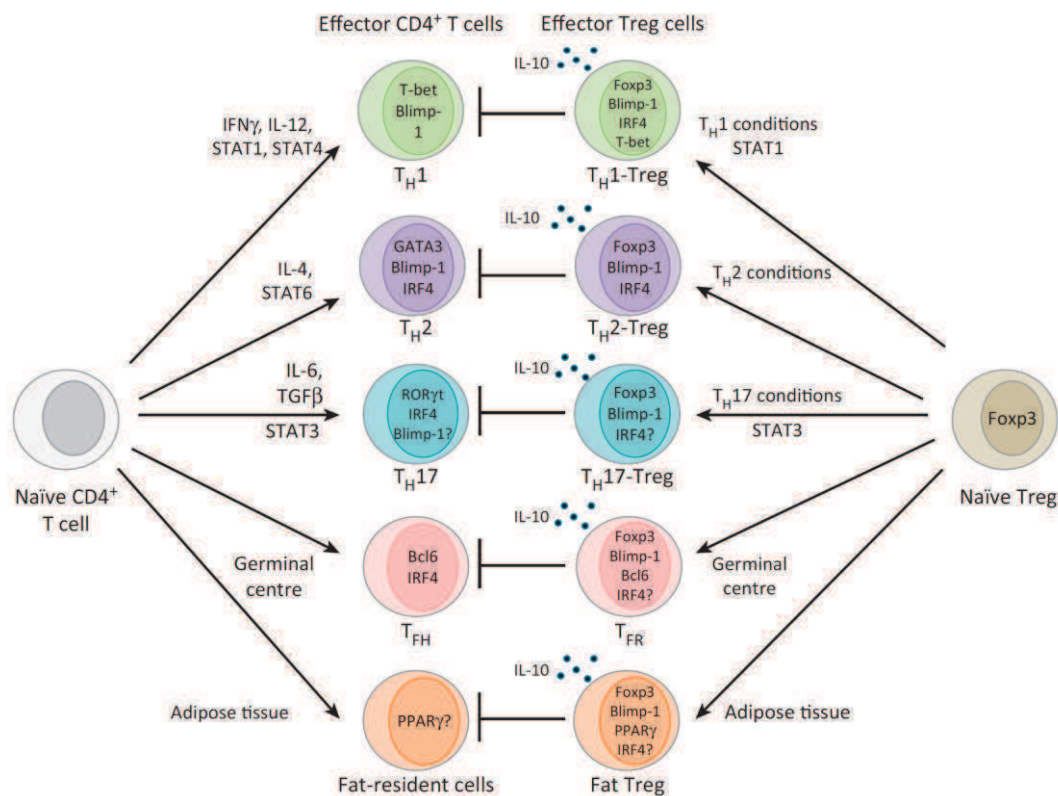


Figure 14 : Différenciations des LTs et des Tregs effecteurs.
Issu de (Cretney et al., 2013)

GATA-3 est un autre facteur de transcription impliqué dans la différenciation Th2 et joue également un rôle important lors de la différenciation périphérique des Tregs en réponse à une inflammation. En effet, les Tregs déficients pour GATA-3 se développent normalement mais ne peuvent pas contrôler l'inflammation causée par la LIP (Lymphopenia Induced Prolifération). Il en résulte une augmentation des réponses Th2 et Th17 et par conséquent une destruction des tissus (Wang et al., 2011; Wohlfert et al., 2011). GATA-3 se fixe à Foxp3 et permet l'expression des gènes ciblés par Foxp3 et de *Foxp3* lui-même.

Le concept que les Tregs expriment les mêmes facteurs de transcription des classes de réponses qu'ils contrôlent a été étendu lorsqu'il a été observé que le facteur de transcription T-bet, qui est codé par le gène *Tbx21*, pouvait être exprimé par les Tregs. T-bet est nécessaire à la différenciation en LTs Th1. Lorsque T-bet est exprimé par les Tregs, il permet l'expression du récepteur CXCR3. Les Tregs peuvent alors migrer, s'accumuler et contrôler les réponses Th1 au niveau des sites inflammatoires (Koch et al., 2009). Il a été récemment mis en évidence un rôle du facteur de transcription STAT-3 dans le contrôle des réponses Th17 par les Tregs. STAT-3 est un facteur de transcription requis pour la génération des LTs Th17, et la déplétion de STAT-3 spécifiquement dans les Tregs induit une colite auto-immune

fatale. En effet, l'expression du récepteur CCR6 est diminuée chez les Tregs déficients pour STAT-3 qui ne peuvent, par conséquent, pas migrer au site inflammatoire et contrôler la pathologie (Chaudhry et al., 2009).

Enfin, il a été découvert plus récemment par deux équipes que les Tregs peuvent exprimer le facteur de transcription Bcl6 qui est nécessaire à la formation des Tfh. Cette population de Tregs, appelée Tregs folliculaires (Tfr), contrôle les réponses T et B des centres germinatifs et présente le même phénotype que les Tfh : ils expriment CXCR5, PD-1 et ICOS mais également un autre facteur de transcription Blimp-1 codé par *Prdm1* (Chung et al., 2011; Linterman et al., 2011). L'ensemble de ces données indique que les Tregs sont capables d'exprimer les facteurs de transcription spécifiques des différents LTs effecteurs.

De façon intéressante, il a été découvert par l'équipe de Diane Mathis et Christophe Benoist une population de Tregs dans le tissu adipeux (Feuerer et al., 2009a). Ces Tregs, dénommés « Fat-resident Tregs », expriment de forts taux d'IL-10, de Blimp-1 et le facteur de transcription PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) (Cipolletta et al., 2012). Ils possèdent une signature transcriptionnelle différente des Tregs isolés des organes lymphoïdes secondaires (Feuerer et al., 2009b). Ces Tregs présentent un répertoire différent des LTconvés trouvés dans le tissu adipeux, ce qui suggère que les « Fat-Tregs » auraient une ontogénie thymique. Enfin, ces Tregs du tissu adipeux sont fortement diminués dans les souris obèses. Ces résultats suggèrent que les « Fat-Tregs » ont un rôle dans le contrôle de l'inflammation associée au tissu adipeux.

Pour conclure, l'ensemble de ces études montre la capacité des Tregs à se différencier en Tregs effecteurs variés, à la périphérie, en réponse au milieu environnemental aussi bien dans les organes lymphoïdes que dans les tissus.

d) Blimp-1 et IRF4 dans la différenciation des Tregs effecteurs.

Blimp-1 est un facteur de transcription important pour la différenciation terminale des LBs (Nutt and Kee, 2007). Il est aussi exprimé par les LTs et joue un rôle dans l'homéostasie et la tolérance au soi (Kallies et al., 2006; Martins et al., 2006). Blimp-1 est exprimé par 10 à 20% des Tregs issus des organes lymphoïdes secondaires alors qu'il est exprimé par la plupart des Tregs isolés des muqueuses (peau, poumon, intestin).

Les Tregs Blimp-1⁺ présentent un phénotype de Tregs activés et produisent de forts taux d'IL-10. En effet, Blimp-1 régule l'expression de plusieurs gènes importants pour les Tregs

notamment les gènes *Il10*, *Icos*, *Ble2*, et *Ccr6* (Cretney et al., 2011) qui ont un rôle respectivement dans leurs fonctions, leur survie et leur capacité de migration. Il semble donc que Blimp-1 joue un rôle important dans la différenciation périphérique des Tregs. L'équipe de Stephen Nutt s'est intéressée à la régulation du gène *Prdm1* dans les Tregs. Il a constaté que les Tregs IRF4^{-/-} n'exprimaient pas le gène *Prdm1* et que dans tous organes ou tissus de l'organisme, il n'y avait alors pas de Tregs effecteurs (Cretney et al., 2011). Il semble donc qu'IRF4 agirait en amont pour induire l'expression de Blimp-1 et que, par conséquent, IRF4 ne jouerait pas un rôle uniquement dans la polarisation Th2 des Tregs mais plus largement dans la différenciation de ces derniers en Tregs effecteurs. Par ailleurs, les souris chez lesquelles les Tregs sont déficients pour IRF4, en plus d'avoir une mauvaise régulation des réponses Th2, présentent de forts taux d'IFN-γ et d'IL-17 couplés à une forte activité des centres germinatifs.

Ces derniers résultats confirment que ces souris présentent un défaut dans la régulation des réponses Th1, Th17 et Tfh dues à l'absence de Tregs effecteurs. Enfin, l'analyse de la chromatine du gène codant pour l'*Il10* dans les Tregs montre qu'IRF4 et Blimp-1 sont nécessaires pour modifier l'activité des histones et permettre la transcription du gène de l'IL-10 (Kallies et al., 2006)(Figure 15).

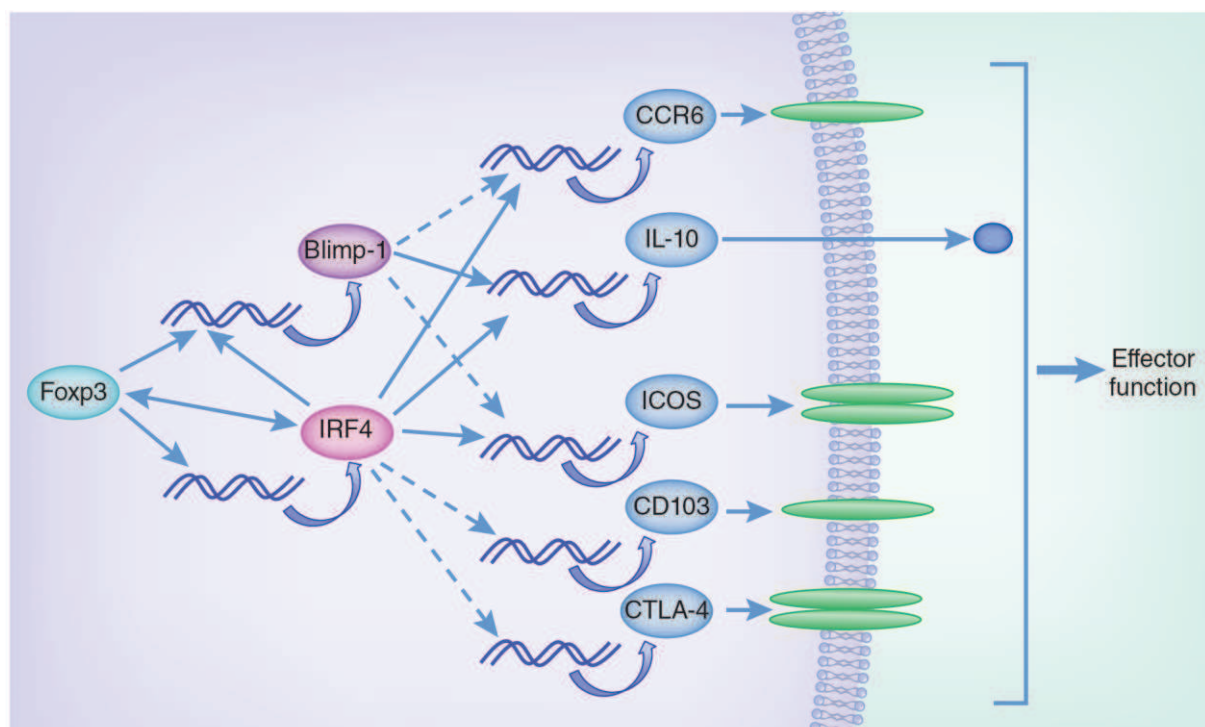


Figure 15 : Rôles de Blimp-1 et IRF4 dans la différenciation en Tregs effecteurs.
Issu de (Ohkura and Sakaguchi, 2011)

Nous venons de voir que les Tregs sont des cellules spécialisées dans la régulation des réponses immunitaires. Ils utilisent de nombreux mécanismes et peuvent agir sur différentes cellules du système immunitaire. Les Tregs possèdent un rôle important dans l'organisme et sont impliqués dans de nombreuses pathologies. Ils peuvent être bénéfiques, comme pour la prévention de l'auto-immunité, mais peuvent être aussi néfastes, comme nous allons le voir plus loin, pour la mise en place d'une réponse efficace anti-tumorale.

3. L'impact des Tregs dans l'organisme

a) *Auto-immunité*

Le rôle central des Tregs dans le contrôle de l'auto-immunité a été clairement défini lorsqu'il a été découvert que l'absence de ces cellules chez l'homme et la souris, causée par la mutation du gène *Foxp3*, entraînait un syndrome auto-immun léthal (Bennett et al., 2001; Brunkow et al., 2001). Un défaut dans la fonctionnalité des Tregs a été souvent mis en cause chez les patients atteints de certaines maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1 (T1D) (Lindley et al., 2005), la myasthénie grave auto-immune (Balandina et al., 2005), le psoriasis (Sugiyama 2005 II), la sclérose en plaques (Viglietta et al., 2004), le lupus (Lyssuk et al., 2007) et l'arthrite rhumatoïde (Ehrenstein et al., 2004). Dans d'autres cas, il a également été observé une réduction du nombre de Tregs chez les patients atteints de lupus (Lee et al., 2006; Miyara et al., 2009) ou de sclérose en plaques (Matarese et al., 2005). Il semble donc qu'une perte de fonction ou une perturbation de l'homéostasie des Tregs faciliterait l'apparition de maladies auto-immunes.

Malgré tout, ce sont des pathologies multifactorielles et l'environnement joue également un rôle sur le déclenchement de ces maladies. Citons quelques exemples parmi de très nombreux décrivant l'effet de l'environnement sur les Tregs. Le $\text{TNF}\alpha$ pourrait entraîner une perte de fonction des Tregs (Valencia et al., 2006) notamment dans l'arthrite rhumatoïde et son inhibition, par injection d'anti- $\text{TNF}\alpha$, semble restaurer les fonctions effectrices des Tregs et de générer une nouvelle population de Treg effectrice (Ehrenstein et al., 2004; Nadkarni et al., 2007). Le $\text{TNF}\alpha$ peut également jouer un rôle positif dans l'activité des Tregs. En effet, il a été récemment montré que dans un contexte auto-immun notamment le T1D, les LTs effecteurs sont capables de « booster » la prolifération des Tregs et ainsi améliorer leur efficacité. Ce « boost » est dépendant du $\text{TNF}\alpha$ mais pas de l'IL-2 (Grinberg-Bleyer et al., 2010). En revanche, dans une étude utilisant un modèle de colite, l'IL-12, une molécule responsable de la différenciation Th1 et considérée comme pro-inflammatoire, permet la

conversion en Tregs effecteurs producteurs d'IFN- γ qui inhibent la maladie (Feng et al., 2011). Enfin, d'autres études montrent que dans certains cas, ce sont les LTs pathogéniques qui seraient résistants à l'action des Tregs (Paust and Cantor, 2005). Ainsi les Tregs peuvent être affectés de plusieurs façons dans les maladies auto-immunes (Tableau 5).

Maladies	Nombre de Tregs (CD4 ⁺ CD25 ^{fort} ou CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺)		Fonctionnalité des Tregs	Résistance à la suppression des LTs effecteurs
	Sang	Tissu		
Diabète de type 1	Normal	ND	Diminuée	Augmentée
Sclérose en plaques	Normal, mais les sous-populations de Tregs sont affectées	Augmenté dans le système nerveux central	Diminuée	Normale
Lupus	Diminué	ND	Diminuée	Augmentée
Arthrite rhumatoïde	Augmenté	Augmenté dans le liquide synovial	Diminuée	Normale
Maladie Inflammatoire de l'intestin	Diminué lors d'un ulcère actif, Normal dans la maladie de Crohn	Augmenté dans la lamina propria et les ganglions mésentériques	Normale	Normale
Psoriasis	Augmenté	Augmenté dans la peau	Diminuée	Augmentée

Tableau 5 : Implication des Tregs dans différentes maladies auto-immunes.

Issu de (Buckner, 2010).

b) Transplantation

Bien que différentes populations de leucocytes (DCs, macrophages, LBs, LTs) puissent participer à la destruction de l'organe ou des cellules transplantés, ils peuvent également aider à long terme à la tolérance du greffon. Il est important de pouvoir contrôler les réponses immunitaires innées et adaptatives après une transplantation. Les Tregs peuvent prévenir le rejet d'une greffe allogénique ou prévenir la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). En effet, les Tregs sont présents en plus forte quantité dans le sang et au site de la greffe chez les patients tolérant leur greffe (Akl et al., 2008; Martinez-Llordella et al., 2007; Meloni et al., 2004). De plus, il a été montré que l'activité immunosuppressive des Tregs doit se faire au niveau du greffon et dans les ganglions lymphatiques drainant le site de la transplantation (Cobbold et al., 2004; Ochando et al., 2005). Ainsi, les cellules régulatrices peuvent jouer sur la balance entre survie et rejet du greffon. Un nombre insuffisant de Tregs, lors d'une transplantation allogénique, est souvent observé lors d'un rejet total du greffon. Cette diminution est corrélée à la présence d'un nombre important de LTs mémoires dirigés contre les allo-antigènes du donneur (Yang et al., 2007). Les Tregs sont en fait fonctionnels mais

sont en trop faibles quantités pour inhiber la réponse allogénique des LTs mémoires. D'autres études ont montré qu'une greffe allogénique peut générer des iTregs alloréactifs ou faire proliférer les Tregs déjà présents dans l'hôte (Steger et al., 2006). Cela a été également démontré même après le rejet d'une première greffe (Tullius et al., 1997). Ces résultats suggèrent qu'une exposition prolongée aux allo-antigènes du donneur induirait la génération d'iTregs alloréactifs et permettrait la tolérance de l'organe transplanté. D'autres approches ont été utilisées pour améliorer la tolérance des greffons. Par exemple, des molécules immunosuppressives ou des alloantigènes ont été injectés pour promouvoir la génération et la fonction des Tregs (Kingsley et al., 2002; Wood et al., 2011). Ces études montrent toutes un rôle primordial des Tregs alloréactifs dans la transplantation. Enfin, une étude récente montre que, dans un modèle de greffe allogénique d'îlots du pancréas, les Tregs transférés migrent du sang jusqu'au greffon et par la suite dans les ganglions drainant le greffon. Au cours de ce processus, les Tregs acquièrent un phénotype effecteur permettant de supprimer les réponses allogéniques (Zhang et al., 2009).

L'utilisation des Tregs en thérapie cellulaire a déjà été réalisée pour différents types de transplantations avec différents protocoles d'injection, d'expansion et de purification de Tregs humains (Tableau 6). L'un des problèmes majeurs de l'utilisation des Tregs en thérapie est que les Tregs humains n'ont pas de marqueur spécifique permettant de les purifier de façon correcte. En effet, les cellules les plus utilisées sont les cellules CD25^{fort} et CD127^{faible} mais, parmi celle-ci, existent plusieurs contaminants, notamment des LTs effecteurs pouvant être pathogéniques pour l'hôte. L'utilisation de molécules immunosuppressives comme la rapamycine permet d'augmenter la pureté des Tregs en culture (Battaglia et al., 2006) en éliminant les autres LTs contaminants.

Équipes	Types de transplantations (n=Nombre de patients)	Types de LTs transférés	Dose de LTs transférée	Protocole d'expansion des Tregs <i>in vitro</i>	Résultats cliniques	Réfs
Trzonkowski (Pologne)	<u>Patient 1</u> : Moelle osseuse <u>Patient 2</u> : SC du sang périphérique. Donneurs HLA compatibles et apparentés	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ du donneur	<u>Patient 1</u> : 1x10 ⁵ /kg <u>Patient 2</u> : 3x10 ⁵ /kg	Billes anti-CD3/CD28 + IL-2 (1000U/ml)	<u>Patient 1</u> : retrait du mycophenolate mofetil et diminution de la prednisone <u>Patient 2</u> : améliorations cliniques temporaires	(Trzonkowski et al., 2009)
Blazar (Minnesota)	Sang de cordons de 2 donneurs différents non apparentés (n=23)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ du sang de cordon d'un 3e donneur	1x10 ⁴ à 3x10 ⁶ /kg (J+1)	Billes anti-CD3/CD28 + IL-2 pendant 18 jours	Réduction de l'incidence de GVHD aigue de grade II à IV dans le groupe traité	(Brunstein et al., 2011)
Martelli (Pérouse)	HSCT HLA-haploidentique (n=28)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ du donneur	2x10 ⁶ /kg (J-4)	Sans manipulation Fraîchement isolés	Très faible incidence d'une GVHD aigue et chronique	(Di Ianni et al., 2011)
Edinger (Ratisbonne)	HSCT chez des patients présentant un haut risque de rechute de leucémie (n=9)	Tregs (>50% FOXP3 ⁺) + LTs effecteurs pour l'effet GVL	5x10 ⁶ /kg	Sans manipulation Fraîchement isolés	Non toxique et faisable après avoir écarté tous signes de déclenchement d'une GVHD	(Edinger and Hoffmann, 2011)
Roncarolo (Milan)	HSCT HLA-haploidentique (n=16)	Tr1 du donneur	1x10 ⁵ CD3 ⁺ /kg (J+30)	Allostimulation en présence d'IL-10 pendant 10 jours	Non toxique et faisable	(Battaglia and Roncarolo, 2011)
Okumura (Japon)	Reins (n=13)	Cellules anergiques du receveur	Cellules anergiques (J+12)	PBMCs autologues cocultivées + cellules irradiées du donneur, + anti-CD80/CD86, pendant 2 semaines	Réduction de l'immunosuppression	(Koyama et al., 2007)

Tableau 6 : Vue d'ensemble des essais de thérapie cellulaire utilisant les Tregs en transplantation. (GVHD = Graft Versus Host Disease, GVL = Graft Versus Leukemia, HSCT = Hematopoietic Stem Cell Transplantation, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell, SC = Stem Cell). *D'après (Wood et al., 2012)*

c) La tolérance fœto-maternelle

Le rôle des Tregs dans la tolérance fœto-maternelle a été souligné par plusieurs observations. Tout d'abord, il a été démontré que lorsqu'une femelle, déficiente en LTs, est reconstituée avec des LTs dépourvus de Tregs, puis accouplée avec un mâle allogénique, il y a résorption des embryons à la mi-gestation. Un tel phénomène ne se déroule pas lorsque la femelle est accouplée avec un mâle syngénique (Aluvihare et al., 2004). Par la suite, il a été découvert

qu'un transfert de Tregs chez une femelle CBA/J diminue le taux de perte des fœtus lorsque cette dernière est accouplée avec un mâle DBA/2J (Zenclussen et al., 2006). Enfin, il a été observé une forte expansion des Tregs chez la souris lors de la gestation (Aluvihare et al., 2004) et cela a été également observé chez la femme pendant la grossesse (Dimova et al., 2011).

Les iTregs, en particulier, ont une place importante dans l'établissement de la tolérance fœto-maternelle. Une étude récente menée par l'équipe d'Alexander Rudensky a montré, dans un premier temps dans un modèle de souris transgéniques, qu'il existait des Tregs spécifiques d'alloantigène paternel dans la décidua et les ganglions lymphatiques drainant les cornes utérines. Dans un second temps, ils ont démontré que le développement de ces Tregs spécifiques était dépendant des séquences du CNS1 de Foxp3. En effet, des souris dépourvues de CNS1, donc ne possédant pas d'iTregs, présentent un taux de résorption des embryons beaucoup plus fort, aussi bien en nombre d'embryons résorbés par femelle que sur l'ensemble d'une cohorte de femelles. L'ensemble de ces résultats se produit lors d'un accouplement allogénique mais pas syngénique (Samstein et al., 2012).

La même année, Jared Rowe et ses collègues ont mis au point un nouveau modèle de tolérance fœto-maternelle. Ils ont généré des mâles transgéniques exprimant, sous le contrôle du promoteur de l'actine, une protéine de fusion composée de l'OVA et d'un peptide (2W1S₅₅₋₆₈) dérivé de la molécule du CMH de classe II I-E^d. Lorsque les mâles transgéniques sont accouplés avec une femelle C57BL/6 non transgénique, l'embryon généré exprime la protéine de fusion comme antigène placentaire. L'antigène diffuse chez la femelle en gestation dans les ganglions lymphatiques et la rate puis est présentée par les DCs I-A^b. Ils observent ainsi que les LTs endogènes spécifiques de 2W1S augmentent fortement pendant la gestation. Ils observent également que la plus forte expansion est celle des Tregs. En effet, avant la gestation, les Tregs représentent 10% des LTs spécifiques de 2W1S alors qu'à la fin de la gestation, ils représentent 60% de ces mêmes LTs. De plus, ils estiment également qu'environ 50% de ces Tregs sont des iTregs générés pendant la gestation. Enfin, lors d'une seconde gestation il y a un plus grand nombre d'iTregs 2W1S et moins de perte d'embryons que lors de la première gestation (Rowe et al., 2012b).

Pour conclure, l'ensemble de ces études montre un rôle clef des iTregs et plus généralement des Tregs dans la tolérance fœto-maternelle vis-à-vis des antigènes paternels et par conséquent dans le développement des embryons.

d) *Les maladies infectieuses*

Le rôle des Tregs dans les réponses immunitaires contre des agents pathogènes est très variable et sujet à controverse. En effet, ils peuvent avoir un rôle délétère pour la mise en place d'une bonne réponse anti-infectieuse ou jouer un rôle protecteur. Les résultats observés dépendent le plus souvent des modèles utilisés, en particulier du type de pathogène provoquant l'infection (virus, bactérie, champignons, parasites) mais également du type d'infection qu'elle soit chronique ou aiguë (Tableau 7). Plusieurs études ont montré un rôle protecteur des Tregs lors des réponses immunes contre certains virus comme l'« Herpes Simplex Virus 2 » (HSV2), « Lymphocytic Choriomeningitis Virus » (LCMV) ou le « West Nile virus ». En effet, la déplétion des Tregs avant une infection intra-vaginale avec le virus HSV2 engendre une mortalité accélérée des souris et un recrutement tardif de cellules immunitaires protectrices dans les voies vaginales et les ganglions drainant, ainsi qu'une augmentation du nombre de virus sur le site de l'infection (Lund et al., 2008). Les effets protecteurs des Tregs ne sont pas limités aux infections des muqueuses. Après une infection systémique par le virus LCMV chez des souris déplétées en Tregs entraîne également une augmentation de la charge virale avec une réduction des concentrations de chimiokines dans les ganglions lymphatiques (Lund et al., 2008). De même, l'ablation des Tregs avant une infection par le West Nile virus chez la souris provoque une mortalité accrue, de moins bons scores cliniques de la maladie, et une perte de poids accélérée. Ces observations ont été associés chacun à une charge virale élevée dans le cerveau et la moelle épinière (Lanteri et al., 2009). De plus, lorsqu'on induit une expansion des Tregs avant infection avec *Taxoplasma gondii* ou *Plasmodium berghei*, les Tregs réduisent les dommages liés à l'infection et permettent la survie des souris infectées (Haque et al., 2010; Oldenhove et al., 2009). À l'inverse, lors d'une infection avec *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ou *Mycobacterium tuberculosis*, le transfert adoptif de Tregs ou leur expansion entraîne une augmentation de la pathogénicité (Johanns et al., 2010; Scott-Browne et al., 2007; Shafiani et al., 2010). De nombreuses expériences ont été réalisées dans d'autres modèles infectieux afin d'observer le rôle protecteur ou délétère des Tregs (Tableau 7).

Type	Pathogène	Impacts des Tregs sur la réponse immune	Commentaires	Réfs
Virus	HSV2	Positif	L'élimination des Tregs accélère la mortalité et augmente la charge virale	(Lund et al., 2008)
	LCMV	Positif	L'élimination des Tregs augmente la charge virale	
	West Nile virus	Positif	L'élimination des Tregs augmente la charge virale et la mortalité	(Lanteri et al., 2009)
Parasite	<i>Plasmodium berghei</i>	Positif	L'expansion des Tregs protège d'une maladie sévère et limite la pathogénicité du pathogène	(Haque et al., 2010)
		Neutre	L'élimination des Tregs en dessous du seuil normal n'impacte pas sur l'expansion du pathogène	(Steeg et al., 2009)
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Positif	La diminution des Tregs après l'infection engendre une infection fatale qui est réversible par l'injection du complexe anti-IL-2-IL-2	(Oldenhove et al., 2009)
	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Neutre	Pas d'augmentation de la pathogénicité après élimination des Tregs	(Rausch et al., 2009)
Champignon	<i>Candida albicans</i>	Positif	Le co-transfert de Tregs avec des LTs CD4 ⁺ effecteurs augmente la clairance du champignon	(Pandiyani et al., 2011)
Bactérie	<i>Listeria monocytogenes</i>	Négatif	L'expansion de Tregs augmente la charge pathogénique	(Rowe et al., 2011)
	<i>Salmonella enterica</i>	Négatif	L'augmentation des Tregs pendant la gestation augmente la charge pathogénique.	
		Négatif	L'élimination des Tregs accélère l'élimination de la bactérie et augmente l'activation des LTs effecteurs	(Johanns et al., 2010)
Mycobactérie	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Négatif	Le Transfert adoptif de tregs spécifiques diminue l'expansion des LTs effecteurs et augmente la pathogénicité	(Scott-Browne et al., 2007)

Tableau 7 : Impacts des Tregs dans les pathologies infectieuses chroniques.

D'après (Rowe et al., 2012a)

Lors d'une réponse dominée par une différenciation Th1 comme dans le cas de l'infection par *M. tuberculosis*, il y a recrutement de LTs effecteurs Th1 T-bet⁺ mais également de Tregs effecteurs T-bet⁺ au niveau du site de l'infection. Ceci entraîne un contrôle de l'infection bactérienne par les LTs effecteurs Th1 qui sont eux même contrôlés par les Tregs. Il en résulte d'une persistance chronique et limitée dans l'espace des mycobactéries (Koch et al., 2009). De même, lors d'une réponse inflammatoire de type Th2 comme dans le cas de l'infection par *Heligmosomoides polygyrus*, il y a un enrichissement du site de l'infection de

Tregs GATA-3⁺ (Wohlfert et al., 2011). Ces résultats sont un exemple de l'importance de la différenciation en Tregs effecteurs.

D'autre part, il est intéressant de souligner que la fonction des Tregs peuvent être altérée par le pathogène car ils expriment certains TLRs (Toll-Like Receptors). En effet, lors d'une stimulation par un agoniste de TLR2 chez la souris ou TLR8 chez l'homme, les Tregs voient leurs capacités suppressives diminuées (Liu et al., 2006; Peng et al., 2005; Suttmüller et al., 2006). Mais d'autres molécules microbiennes peuvent stimuler les fonctions suppressives des Tregs, comme le LPS qui, via le TLR4, augmente les fonctions suppressives des Tregs CD25⁺ murins (Caramalho et al., 2003) ou encore la flagelline qui, via le TLR5, augmente les fonctions des Tregs humains (Crellin et al., 2005). L'activation des Tregs par ces bactéries pourraient inhiber les réponses immunes contre les pathogènes à leur bénéfices. Enfin, une étude intéressante a montré que, très tôt lors d'une infection chronique par *Salmonella*, lorsque la réponse effectrice est encore faible, le nombre de bactéries augmente progressivement ; cela corrèle avec une augmentation des fonctions effectrices des Tregs. Puis, à un stade plus avancé de l'infection, les LTs effecteurs sont très activés et réduisent progressivement la charge pathogénique. En parallèle, le pouvoir suppresseur des Tregs est diminué (Johanns et al., 2010).

Prises ensemble, ces études suggèrent que certains agents pathogènes ont développés des stratégies pour moduler la fonctionnalité des Tregs à leurs bénéfices au cours de l'évolution.

e) Les Tregs dans le cancer

Il est maintenant acquis que les Tregs jouent un rôle très important dans l'échappement tumoral. Vers la fin des années 90, il a été montré que le volume tumoral corrélait avec le nombre de Tregs (Shimizu et al., 1999) et que la déplétion *in vivo* des Tregs CD25⁺ retardait la croissance tumorale (Onizuka et al., 1999). À l'inverse, un transfert adoptif de Tregs entraîne une diminution de la réponse anti-tumorale (Turk et al., 2004). Plusieurs composantes sont à prendre en compte pour comprendre le rôle des Tregs dans le cancer, notamment leur localisation, leur nombre ou encore leur spécificité antigénique. Les Tregs expriment de nombreux récepteurs aux chimiokines (Wei et al., 2006) et peuvent être recrutés au sein du microenvironnement tumoral via les chimiokines que sécrètent les tumeurs comme CCL22, CCL17 et CCL5 (Curiel et al., 2004; Ishida et al., 2006; Tan et al., 2009). L'accumulation des Tregs dans la tumeur ou dans les ganglions drainant la tumeur peut également résulter d'une prolifération. Dans différents types de tumeurs, il y a, en effet, une

forte proportion de Tregs Ki-67⁺ (Wang et al., 2005). De plus, les cellules tumorales et les DCs tolérogènes produisent du TGFβ et de l'IDO ce qui contribuerait à la prolifération des Tregs.

Un autre facteur important est la spécificité antigénique des Tregs ainsi que leur origine. La présence de Tregs spécifiques d'antigènes tumoraux dans le mélanome (Vence et al., 2007; Wang et al., 2004) ou dans le cancer colorectal (Bonertz et al., 2009) a été démontrée. Les résultats de ces études suggèrent que les Tregs inhibent les réponses anti-tumorales de façon antigène spécifique. Les LTs effecteurs sont également spécifiques d'antigènes tumoraux. Par ailleurs il a été décrit que les Tregs présents dans le microenvironnement tumoral pourraient être des iTregs. En effet, les cellules tumorales produisent du TGF-β (Liu et al., 2007) et de l'IL-10 (Seo et al., 2001), deux cytokines connues pour induire des iTregs. Les cellules tumorales produisent aussi de la cyclooxygénase-2 (COX-2) qui permet la synthèse de prostaglandine E₂ (PGE₂) qui induit Foxp3 dans les LTs naïfs et augmente la fonctionnalité des Tregs (Sharma et al., 2005). Enfin, les cellules myéloïdes, en particulier, les MDSCs (Myeloid-Derived Suppressor Cell), participent à l'induction d'iTregs notamment via la production de TGF-β (Huang et al., 2006) et d'acide rétinoïque (Hoechst et al., 2011). Les DCs tolérogènes peuvent aussi participer à la génération d'iTregs via la production d'IDO (Baban et al., 2009). Ainsi, une quantité non négligeable de Tregs présent dans la tumeur serait d'origine périphérique.

Cependant, la possibilité que les Tregs infiltrant les tumeurs soient d'origine thymique a été proposée par l'équipe de Gallimore. Dans l'une de leurs études, ils ont noté que les répertoires TCR des Tregs et des LTs effecteurs infiltrant les tumeurs étaient largement distincts, suggérant ainsi une origine thymique des Tregs (Hindley et al., 2011). Dans un autre modèle, une étude a également démontré, grâce à une analyse par immunoscope du répertoire des Tregs et des LTs effecteurs infiltrant la tumeur, que chaque population présentait un répertoire TCR très différent (Sainz-Perez et al., 2012).

Comme nous l'avons vu, les nTregs sont sélectionnés dans le thymus avec des TCRs spécifiques d'antigènes du soi. Or, il a été montré que la plupart des TAAs (Tumor Associated Antigens) étaient des antigènes du soi (Khong and Restifo, 2002). Une étude émet l'hypothèse que la protéine AIRE soit impliquée dans la génération des nTregs spécifiques des TAAs. En effet, TRP-1 (Tyrosinase Related Protein-1) est un antigène de mélanome et est exprimé dans thymus sous le contrôle d'AIRE. Les souris TRP-1 TCR Tg

RAG^{-/-} génèrent des nTregs spécifiques de TRP-1. Mais lorsque l'expression d'AIRE est affectée dans ces souris, on observe une forte diminution, du pourcentage de Tregs spécifiques dans le thymus et la périphérie. Ces résultats indiquent que le développement des Tregs spécifiques des TAAs pourrait être contrôlé par la protéine AIRE, suggérant ainsi que les Tregs infiltrant les tumeurs sont d'origine thymique (Zhu et al., 2013).

Plus récemment, le groupe de Peter Savage a souligné un rôle important de la protéine AIRE dans la génération de Tregs pouvant infiltrer les tumeurs. En effet, dans un modèle de cancer de la prostate, l'existence, au sein de la tumeur, d'une population de Tregs exprimant un TCR spécifique d'un antigène de la prostate a été mis en évidence. L'équipe démontre que ces Tregs sont également présents au niveau de la prostate des souris sans tumeur et que leur développement est dépendant de l'expression Aire, suggérant ainsi une origine thymique de ces Tregs (Malchow et al., 2013).

L'ensemble de ces études révèle que les Tregs infiltrant les tumeurs peuvent être d'origine thymique ou d'origine périphérique.

Les Tregs sont capables d'inhiber la fonctionnalité des LTs effecteurs anti-tumoraux, qu'ils soient CD4⁺ ou CD8⁺. Lorsque les Tregs sont déplétés *in vivo*, il y a alors expansion des LTs CD8⁺ spécifiques producteurs d'IFN γ . Les Tregs peuvent agir également en activant le récepteur PD-1 exprimé sur les LTs CD8⁺ via leur expression de PD-L1, inhibant ainsi la prolifération et les fonctions effectrices de ces derniers (Wang et al., 2009). Ils peuvent éliminer les LTs CD8⁺ par cytolysse via le granzyme B (Cao et al., 2007). Les Tregs peuvent également limiter le « priming » des LTs CD8⁺ spécifiques dans les ganglions drainant la tumeur en tuant les DCs présentes via la voie perforine/granzyme (Boissonnas et al., 2010).

D'autres cellules effectrices de la réponse anti-tumorale sont aussi inhibées par les Tregs. En effet, les cellules NK, qui sont connues pour être de bons effecteurs anti-tumoraux, sont lysées par les Tregs via la voie perforine/granzyme B (Cao et al., 2007) ou bien inhibées par le TGF β (Smyth et al., 2006). De plus, l'équipe de Rudensky a récemment étudié le fait que les Tregs perturberaient l'homéostasie des NKs effecteurs en les privant d'IL-2 (Gasteiger et al., 2013a). D'autre part, la déplétion des Tregs entraîne une augmentation du nombre de NKs au sein de la tumeur (Gasteiger et al., 2013b).

Notre équipe a récemment démontré que les Tregs pouvaient agir sur l'action anti-tumorale des monocytes. En effet, nous avons montré, dans un modèle de mélanome spontané, que les

Tregs s'accumulent dans la peau, la rate et les ganglions drainant la tumeur lorsque ces souris ne développent pas de vitiligo. Lorsque les Tregs sont déplétés ou lorsque l'IL-10 est neutralisée dans ces souris, nous avons observé une augmentation de l'incidence du vitiligo, corrélée à une diminution des métastases. Nous avons également observé une accumulation de monocytes inflammatoires au niveau de la peau présentant un vitiligo actif. Nos résultats indiquent que les Tregs favorisent la progression tumorale du mélanome, en inhibant le recrutement ou la différenciation des monocytes inflammatoire dans la peau (Pommier et al., 2013). Enfin, les Tregs peuvent avoir une influence directe sur les cellules tumorales : ils vont activer le récepteur RANK, exprimé par les cellules tumorales, et stimuler leur prolifération ainsi que leur capacité à métastaser (Tan et al., 2011).

En conclusion, les Tregs jouent, de par leurs propriétés suppressives, un rôle important dans l'inhibition des réponses anti-tumorales et, par conséquent, favorisent la progression des tumeurs. Toutefois, dans de rares cas, il a pu être observé que la présence de Tregs dans l'environnement tumorale pouvait être de bon pronostique. Notamment, dans le cadre des cancers du cou, de la vessie, de l'ovaire et colorectaux (Fridman et al., 2012).

Nous venons de voir dans ce chapitre les multiples rôles que jouent les Tregs dans l'organisme. Ils sont également impliqués dans d'autres réponses immunitaires que je n'ai pas citées ici (l'allergie, l'asthme...). Ils ont un rôle parfois délétère, parfois bénéfique selon la réponse en question. D'après l'ensemble de ces études, il apparaît que plusieurs aspects de la biologie des Tregs sont importants dans le développement de pathologies, notamment leur fonctionnalité, leur prolifération ou encore leur survie ; on peut observer que dans certaines pathologies comme les maladies auto-immunes ou infectieuses, l'homéostasie des Tregs est perturbée. Il semble donc important de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans leur homéostasie.

D. Facteurs impliqués dans l'homéostasie et la fonction des Tregs

1. Le rôle des interactions avec le soi

Depuis le regain d'intérêt pour les Tregs dans les années 90, une hétérogénéité des Tregs a été décrite. Celle-ci est caractérisée par des différences phénotypiques, ou d'origine (nTregs versus iTregs), ou d'autres propriétés biologiques. En 2003, l'équipe de Benoît Salomon a mis en évidence qu'il existait deux types de Tregs CD25⁺. Grâce à des expériences d'incorporation de BrdU (BromodéoxyUridine) et des transferts adoptifs, ils ont montré

qu'une population de Tregs issue des ganglions lymphatiques ou de la rate prolifère de façon spontanée à l'état basal, et que cette population de Tregs présente un phénotype activé. De plus, ils suggèrent que ces Tregs reconnaissent des antigènes du soi issus des tissus périphériques (Fisson et al., 2003). Ces résultats mènent à penser qu'il existe une population de Tregs en cycle reconnaissant les antigènes du soi.

D'autres études se sont portées sur la reconnaissance du soi et l'importance du CMH de classe II dans l'homéostasie des Tregs en périphérie. Le transfert de Tregs dans une souris lymphopénique et déficiente pour la chaîne β du CMH de classe II I-A ($I-A\beta^{-/-}$) résulte en une diminution de leur prolifération et de leur survie (Gavin et al., 2002). La même année, l'équipe d'Alfred Singer a montré qu'en transférant des LTs $CD4^{+}$ totaux dans une souris double transgénique, à la fois $I-A\beta^{-/-}$ et $Zap70^{-/-}$, environ 7 fois moins de Tregs $CD25^{+}$ étaient répertoriés, après 2 mois de transfert par rapport à un transfert dans une souris $Zap70^{-/-}$ (Bhandoola et al., 2002). Ces résultats indiquent que les Tregs auraient besoin des interactions avec le CMH de classe II pour survivre. Toutefois, ces études précédentes ont été réalisées dans des hôtes lymphopéniques, suggérant plutôt un rôle des molécules du CMH de classe II dans la LIP (Lymphopenia Induced Proliferation) des Tregs, que dans leur survie. De plus, peu de temps après, notre équipe a démontré que les souris $I-A\beta^{-/-}$ n'étaient pas totalement déficientes pour les molécules de CMH de classe II puisqu'il y avait formation d'une molécule du CMH de classe II hybride $I-A\alpha$ $I-E\beta$ (Martin et al., 2003). Nos résultats renforcent l'hypothèse d'un rôle des molécules du CMH de classe II dans la LIP plutôt que dans la survie des Tregs.

En 2006, une étude a été réalisée sur des souris conditionnelles où les molécules du CMH de classe II sont délétées sur la majorité des CPAs en périphérie. Ces souris ont un nombre de Tregs $Foxp3^{+}$ réduit de moitié et ces Tregs présentent une forte diminution de l'expression du récepteur $CD25$ (Shimoda et al., 2006). L'absence d'interaction avec les molécules du CMH de classe II perturberait l'homéostasie des Tregs en diminuant leur sensibilité à l'IL-2.

Au vu de ces différentes études, le rôle du CMH de classe II dans la survie des Tregs ne peut être clairement établi, des études complémentaires sont nécessaires afin de préciser son implication dans la survie des Tregs.

2. Le rôle des cytokines de la famille γ c

Comme nous l'avons vu précédemment, les Tregs sont caractérisés par l'expression du récepteur CD25. Bien qu'induisant la prolifération et l'expansion clonale des LTconv, l'IL-2 régule également l'activité des Tregs. Il est maintenant connu que l'IL-2 est impliquée dans la survie des Tregs. En effet, les souris déficientes en IL-2, CD25 ou CD122, présentent une forte diminution du nombre de Tregs à la périphérie (Fontenot et al., 2005a; Malek et al., 2002). Ces souris développent un syndrome lymphoprolifératif et une auto-immunité sévère (Sakaguchi et al., 2008). De plus, l'injection d'un anticorps anti-IL-2 aboutit à une élimination des Tregs en périphérie chez la souris. L'ensemble de ces résultats montre que l'IL-2 est essentielle à l'homéostasie des Tregs (Setoguchi et al., 2005). L'IL-2 participe à la survie des Tregs en induisant, en particulier, l'expression du facteur Bcl-2 (Tang et al., 2008). Elle active plusieurs voies de signalisation dont la voie JAK1/JAK3/STAT5. Les souris *Jak3*^{-/-} ainsi que les souris *Stat5*^{-/-} possèdent une très faible quantité de Tregs Foxp3⁺ thymiques et périphériques (Yao et al., 2007). Chez l'homme, une diminution du nombre de Tregs CD25^{fort} a été observée chez les patients atteints d'une mutation du gène *STAT5B* (Cohen et al., 2006). Une activation constitutive de Stat5 en absence d'IL-2 est suffisante pour augmenter le nombre de Tregs (Antov et al., 2003).

Ces résultats suggèrent que, même si l'IL-2 joue un rôle crucial dans le maintien des Tregs, d'autres cytokines, dont la signalisation serait dépendante de Stat5, pourraient avoir un rôle dans l'homéostasie de ces cellules. L'IL-7 et IL-15 sont deux cytokines qui activent le facteur Stat5. Bien que les souris déficientes en IL-7 ou en IL-15 ne présentent pas de diminution du nombre de Tregs (Mazzucchelli et al., 2008; Vang et al., 2008), l'absence d'IL-7 ou d'IL-15, combinée à celle de l'IL-2, résulte en une plus forte diminution du nombre de Tregs par rapport à celle observée chez les souris *Il2*^{-/-} ou déficientes pour CD25 (Bayer et al., 2007; Burchill et al., 2007). Malgré le fait que les Tregs expriment faiblement la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (IL-7R α), l'IL-7 permet, en absence d'IL-2, la survie et l'expansion des Tregs en périphérie (Kim et al., 2012; Simonetta et al., 2012). Enfin, l'IL-7 serait même indispensable au maintien des Tregs mémoires dans les tissus (Gratz et al., 2013). Ainsi nous venons de voir que les cytokines de la famille γ c ont un rôle très important dans le maintien des Tregs. Cependant, le TGF β joue également son rôle dans l'homéostasie des Tregs comme ont pu le démontrer les équipes d'Alexander Rudensky et de Richard Flavell (Li et al., 2006; Marie et al., 2005; Marie et al., 2006). L'équipe de Rudensky démontre que les souris *Tgf- β 1*^{-/-} possèdent un pourcentage de Tregs normal dans le thymus et présentent une diminution du

pourcentage et du nombre de Tregs dans la rate. L'absence de TGF- β 1 entraîne une diminution de l'expression de Foxp3 dans les Tregs et perturbe leur homéostasie ainsi que leurs fonctions suppressives (Marie et al., 2005). L'équipe de Flavell s'est intéressée à l'effet du récepteur TGF- β de type II (TGF- β RII) sur les LTs CD4⁺. En utilisant, des souris CD4Cre TGF β RII^{flox/flox}, les auteurs démontrent que l'absence de signalisation du TGF- β RII entraîne une diminution du pourcentage de Tregs dans la rate et les ganglions de ces souris mais, de façon surprenante, ils observent également que l'absence de cette signalisation permet une prolifération plus accrue des Tregs dans le thymus, la rate et les LNs de ces souris (Li et al., 2006).

3. Effets des molécules inflammatoires

a) *L'IL-1, l'IL-6 et le TNF α*

En conditions inflammatoire, il est concevable d'imaginer que la présence de cytokine pro-inflammatoire puisse modifier l'activité des Tregs, aussi bien au niveau de leurs fonctions suppressives qu'au niveau de leur homéostasie. L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire possédant des effets pléiotropiques. Elle est impliquée dans les systèmes nerveux et endocrinien ainsi que dans la protection de l'organisme en facilitant la migration des LTs au niveau des sites d'infection. Le rôle de l'IL-1 sur les Tregs a été peu étudié malgré le fait que les Tregs expriment le récepteur à l'IL-1. Toutefois, il a été démontré que l'IL-1 joue un rôle dans la prolifération des Tregs *in vitro* mais uniquement en présence de DCs matures (Brinster and Shevach, 2008). De plus, il a été montré que l'IL-1 ne joue pas un rôle dans les fonctions suppressives des Tregs (Kubo et al., 2004). Les travaux de Kubo démontrent également que l'IL-1 potentialise l'effet de l'IL-6 sur la prolifération des Tregs (Kubo et al., 2004).

L'IL-6 est également une cytokine pléiotropique avec diverses activités biologiques notamment dans le système immunitaire, l'hématopoïèse, l'inflammation et l'oncogenèse. L'IL-6 induit la différenciation des LTnaïfs en LTs Th17 en présence de TGF- β et inhibe la différenciation en iTreg (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Récemment, une équipe a étudié le rôle de cette cytokine sur la fonctionnalité des Tregs. Dans cette étude les auteurs utilisent un modèle de souris transgénique possédant de façon constitutive un fort taux sérique d'IL-6. De manière intéressante, cette souris présente un plus grand nombre de Tregs en périphérie par rapport aux souris non transgénique, mais présentent un plus faible taux d'iTregs, qui sont caractérisés dans cette étude comme Foxp3⁺ Hélio3⁻. Les nTregs sont

fonctionnels *in vitro* et sont capables de prévenir l'apparition de l'IBD (Fujimoto et al., 2011). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'IL-6 est une cytokine qui participe, comme l'IL-1, à la prolifération des Tregs mais ne modifie pas leur fonctionnalité.

Le TNF α est une autre cytokine pro-inflammatoire pouvant modifier l'activité des Tregs. Le TNF α signale à travers deux récepteurs principaux : le TNFR1 et le TNFR2. Le TNFR1 est ubiquitaire alors que l'expression du TNFR2 est plus restreinte. Contrairement aux LTs effecteurs, une importante proportion de Tregs exprime TNFR2 et son expression est augmentée après activation (Chen et al., 2007b; Valencia et al., 2006). Des études très récentes montrent que les souris TNF $\alpha^{-/-}$ et TNFR2^{KO} possèdent un nombre réduit de Tregs en périphérie (Chen et al., 2013b; Chopra et al., 2013). Ces résultats suggèrent un rôle du TNF α dans l'homéostasie des Tregs. De plus, le TNF α , en présence d'IL-2, augmente la prolifération des Tregs *in vitro* (Chen et al., 2007b). Il semble donc que le TNF α participe à l'homéostasie et la prolifération des Tregs, mais son effet sur les capacités suppressives est plus controversé. *In vitro*, les Tregs issus des souris TNFR2^{KO} ont des capacités suppressives similaires à celles des Tregs de souris WT (van Mierlo et al., 2008). *In vivo*, il a été également montré que le TNF α produit par les LTs effecteurs augmente la prolifération et les fonctions suppressives des Tregs (Grinberg-Bleyer et al., 2010). Toutefois, le transfert de Tregs TNFR2^{KO} dans une souris RAG2^{-/-} ne permet pas de contrôler le développement de l'IBD induit par le transfert de LTnaïfs (Housley et al., 2011). De plus, chez l'homme, plusieurs études ont suggéré que le TNF α réduisait les fonctions suppressives des Tregs (Nagar et al., 2010; Valencia et al., 2006; Zanin-Zhorov et al., 2010). Enfin, il est important de noter que le TNF α peut intervenir sur l'activité des LTs effecteurs. En effet, il a été démontré que les LTs effecteurs TNFR2^{KO} sont moins sensibles à la suppression par les Tregs (Chen and Oppenheim, 2010). L'ensemble de ces résultats montrent que le TNF α et sa signalisation via le TNFR2 participent à l'homéostasie des Tregs et à leurs fonctions suppressives mais que son effet dépend du contexte environnemental et de la présence d'autres LTs.

En conclusion, l'IL-1 et l'IL-6 semblent avoir peu d'impact sur les fonctions suppressives des Tregs contrairement au TNF α , bien que son mécanisme d'action n'est pas clairement élucidé et que d'autres études sont nécessaires pour étudier l'effet de ces cytokines sur les Tregs. Leur rôle semble plus axer sur l'expansion des Tregs en conditions inflammatoires. De manière intéressante, le TNF α , en plus de faire proliférer les Tregs, permet d'augmenter l'expression de certaines protéines et récepteurs de la super famille du TNF à la surface des Tregs tels que

OX40 et 4-1BB (Hamano et al., 2011). Ces protéines peuvent également participer à la régulation de l'homéostasie et aux fonctions suppressives des Tregs.

b) Les récepteurs de la famille du TNF.

Les récepteurs de la super famille du TNF sont très nombreux. Ainsi, je développerai dans cette partie les effets des récepteurs les plus étudiés sur les Tregs. Le récepteur GITR est exprimé de façon constitutive sur les Tregs (McHugh et al., 2002). Il semble que la stimulation de GITR entraîne des effets antagonistes entre la prolifération et les fonctions suppressives des Tregs. En effet, l'administration *in vivo* d'un Ac anti-GITR diminue les fonctions régulatrices des Tregs mais induit leur prolifération (Shimizu et al., 2002). *In vitro*, les mêmes effets ont pu être observés lorsque l'on ajoute le ligand soluble de GITR pendant le test suppression. En effet, il a été remarqué une augmentation de la prolifération des Tregs mais également une diminution de leurs fonctions suppressives (Ji et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs démontrent que l'effet de GITR sur la prolifération nécessite la présence d'IL-2 (Ji et al., 2004). Une autre étude vient compléter ces résultats en démontrant que la stimulation de GITR sur les LTs effecteurs induit leur prolifération et augmentent leur résistance à la suppression médiée par les Tregs (Stephens et al., 2004). De façon élégante et surprenante, les auteurs démontrent qu'en ciblant la stimulation de GITR uniquement sur les Tregs, ils augmentent leurs fonctions suppressives (Stephens et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que GITR joue un rôle dans la prolifération et les fonctions régulatrices des Tregs mais limite leur activité régulatrice lorsqu'il est aussi stimulé sur les LTs effecteurs.

Comme je l'ai cité précédemment les Tregs expriment à leur surface d'autres récepteurs de la famille du TNF. OX40 et 4-1BB sont 2 protéines de cette famille de récepteurs exprimée de façon constitutive sur les nTregs. Les souris OX40^{-/-} présentent un nombre réduit de nTregs dans le thymus et la rate jusqu'à l'âge de 12-13 semaines. Puis, le nombre de Tregs devient normal et se stabilise (Takeda et al., 2004). De plus, aucun défaut en Tregs n'a été retrouvé dans les souris Foxp3eGFP OX40^{-/-} (Vu et al., 2007). Enfin, les souris 4-1BB^{-/-} présentent également un nombre de Tregs normal (Choi et al., 2004; Kwon et al., 2002). C'est résultats indiquent que ces molécules ne sont pas impliquer l'homéostasie des Tregs. Toutefois, il a été montré que c'est 2 protéines permettraient de promouvoir la prolifération des Tregs *in vitro* en présence d'IL-2 (Elpek et al., 2007; Takeda et al., 2004; Zheng et al., 2004a). Plusieurs études ont montré le rôle d'OX40 et de 4-1BB dans les fonctions suppressives des Tregs mais cela reste controversé. En effet, les premières études *in vitro* et *in vivo* ont montré un rôle délétère

de ces 2 protéines dans les fonctions régulatrices des Tregs (Choi et al., 2004; Kwon et al., 2002; Takeda et al., 2004; Valzasina et al., 2005). Enfin, des études plus récentes ont montré un rôle positif de l'activation d'OX40 et de 4-1BB pour les capacités suppressives des Tregs notamment dans l'EAE (Kim et al., 2011b), la transplantation cardiaque (Xiao et al., 2012) ou encore l'IBD (Griseri et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats révèle plusieurs points communs entre ces différents récepteurs sur leurs rôles dans l'homéostasie, la prolifération et les capacités suppressives des Tregs. D'une part, leurs activations aident les Tregs à proliférer et d'autre part, elles limitent les fonctions des Tregs. Dans ces études, 2 mécanismes sont mis en avant pour expliquer cette perte de fonctions. Soit, ces molécules inhibent directement l'activité régulatrice des Tregs, soit, elles agissent sur les LTs effecteurs en induisant des signaux qui les rendent résistants à la suppression. Ainsi, il apparaît que GITR, OX40 et 4-1BB peuvent inhiber la suppression réalisée par les Tregs, mais des études complémentaires sont nécessaires pour une meilleure compréhension des cellules et des ligands agissant sur ces récepteurs.

4. Les autres signaux de survie

De nombreux autres mécanismes sont en jeu dans la survie des Tregs et le maintien de leur homéostasie. Les signaux de co-stimulations en font partie. L'interaction des molécules CD80 et CD86 avec la molécule de co-stimulation CD28 est indispensable au développement et au fonctionnement des Tregs (Salomon et al., 2000). Tang et ses collègues se sont intéressés au rôle de CD28 dans l'homéostasie des Tregs, et ont démontré que des LTconv convs dépourvus de co-stimulation ne peuvent pas produire l'IL-2 nécessaire à l'homéostasie des Tregs (Tang et al., 2003). D'autres travaux réalisés dans un modèle de chimère de moelle osseuse, issue de souris où les DCs sont déficientes pour l'expression des molécules CD80 et CD86, montrent qu'il y a une réduction du pourcentage et du nombre de Tregs en périphérie mais pas dans le thymus (Bar-On et al., 2011). Il convient de noter qu'à l'état physiologique, les DCs présentes dans les ganglions lymphatiques sont immatures ou semi-matures, c'est-à-dire qu'elles n'expriment pas ou faiblement les molécules de co-stimulation (Azukizawa et al., 2011). Toutefois, elles peuvent, dans une moindre mesure que les DCs matures, permettre l'expansion des Tregs *in vitro* (Fehervari and Sakaguchi, 2004). Enfin, il a été observé très récemment que l'absence totale de CD28 sur les Tregs limite leur prolifération *in vitro* (Zhang et al., 2013).

Dans la littérature, il est décrit que d'autres molécules de co-stimulations sont nécessaires à l'homéostasie des Tregs. Il a été récemment proposé que les Tregs ICOS^{fort} représentent une population proliférant plus fortement *in vitro* et *in vivo* que les Tregs ICOS^{-/faible}. Les Tregs ICOS^{-/faible} isolés de la rate ou des ganglions présentent un pourcentage de cellules Annexine V⁺ plus fort et expriment plus fortement les gènes pro-apoptotiques *Bad* et *Bax* que leurs homologues ICOS^{fort}. Enfin, les Tregs ICOS^{-/faible} sont moins suppresseurs *in vitro* (Chen et al., 2012). Il a également été démontré, chez les souris NOD pré-diabétiques, que les Tregs infiltrant les îlots du pancréas sont essentiellement ICOS^{fort}, produisent plus d'IL-10 et sont plus sensibles *in vitro* à l'IL-2 que leurs homologues ICOS^{-/faible}. Cette meilleure sensibilité à l'IL-2 des Tregs ICOS^{fort} permet d'augmenter le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Kornete et al., 2012). Enfin, lorsque les souris ICOS^{-/-} sont infectées par *Heligmosomoides polygyrus* ou *Schistosoma mansoni*, les Tregs développent une apoptose accrue (Redpath et al., 2013). Toutefois, l'ensemble de ces résultats suggère que le rôle d'ICOS est le reflet d'une meilleure réponse à l'IL-2 plutôt que de l'engagement de la molécule ICOS en elle-même et que par conséquent les Tregs ICOS^{fort} survivent préférentiellement.

D'autres facteurs ou molécules peuvent entrer en jeu dans le maintien du pool de Tregs. En effet, d'autres médiateurs extracellulaires peuvent déclencher l'apoptose des Tregs, notamment la NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et l'ATP. Les Tregs sont très sensibles à la mort déclenchée par ces deux composés ; les souris déficientes pour le récepteur P2X7, récepteur de ces deux molécules, possèdent un nombre de Tregs plus élevé (Aswad et al., 2005). Une étude plus récente montre qu'une déplétion sélective des Tregs peut être réalisée par l'injection de NAD et que les souris déficientes pour l'ectoenzyme CD38, qui catalyse la NAD en ADP ribose cyclique, présentent un plus faible nombre de Tregs que des souris WT (Hubert et al., 2010).

En 2007, le groupe de Shimon Sakaguchi révèle que les Tregs expriment très fortement le récepteur 4 au folate (FR4). Il montre qu'en bloquant l'activité de ce récepteur par un Ac F(ab)', le nombre de Tregs diminue fortement dans le sang périphérique. La voie du folate jouerait donc un rôle important dans la survie des Tregs (Yamaguchi et al., 2007). Par la suite, il a été montré que l'acide folique était nécessaire à la survie des Tregs au niveau du colon. En effet, lorsque des souris ont été nourries sans acide folique, le nombre de Tregs dans le colon décroît fortement. De plus, une diminution de l'expression des gènes anti-apoptotique Bcl-2 et Bcl-xL a été observée dans les Tregs de ces souris, ainsi qu'une proportion plus forte de Tregs Annexine V⁺ (Kinoshita et al., 2012). Une autre équipe a confirmé ces résultats en démontrant

qu'une carence en vitamine B9 (autre nom de l'acide folique) diminuait le nombre de Tregs dans l'intestin et que l'expression du gène Bcl-2 était diminuée dans ces Tregs (Kunisawa et al., 2012). Ces études montrent un rôle important de l'acide folique dans la régulation de l'homéostasie des Tregs, particulièrement au niveau intestinal.

La flore commensale joue également un rôle important dans l'homéostasie des Tregs du colon. Très récemment, deux études portant sur la composition du microbiome et de son influence sur l'homéostasie ont été publiées. La première montre que les produits issus de la fermentation des bactéries commensales, les SCFAs (Short-Chain Fatty Acids) régulent l'homéostasie des Tregs du colon via leur fixation sur le récepteur GPR43, qui est très exprimé par les Tregs du colon. Les souris *Ffar2*^{-/-} (gène codant pour GPR43) possèdent un faible nombre de Tregs dans le colon avec des fonctions suppressives diminuées (Smith et al., 2013). Dans la seconde étude, les auteurs ont colonisé les souris ne possédant pas de flore commensale [souris Germ Free (GF)] avec des souches de *Clostridia* provenant du microbiote intestinal humain. Les résultats montrent qu'une telle flore permet de générer des iTregs et donc d'augmenter le pool de Tregs du colon des souris GF (Atarashi et al., 2013). Ces deux études mettent en lumière le rôle primordial des bactéries commensales dans l'homéostasie des Tregs intestinaux.

5. Mécanismes d'apoptose des Tregs

La mort cellulaire programmée joue un rôle critique dans le développement des LTs et notamment des Tregs. L'apoptose est le processus principal qui régule l'homéostasie des cellules hématopoïétiques. Il existe principalement deux voies qui contrôlent l'apoptose : la voie des facteurs extrinsèques qui utilisent les récepteurs de mort, et la voie intrinsèque qui est initiée lorsqu'il y a un stress cellulaire. Cette dernière est une balance entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille des protéines Bcl-2, qui aboutit à l'activation des protéines Bax et Bak. L'activation de Bax et Bak est le point de non-retour de la voie intrinsèque. Enfin, ces deux voies convergent vers l'activation des caspases qui sont les protéines effectrices de l'apoptose (Figure 16).

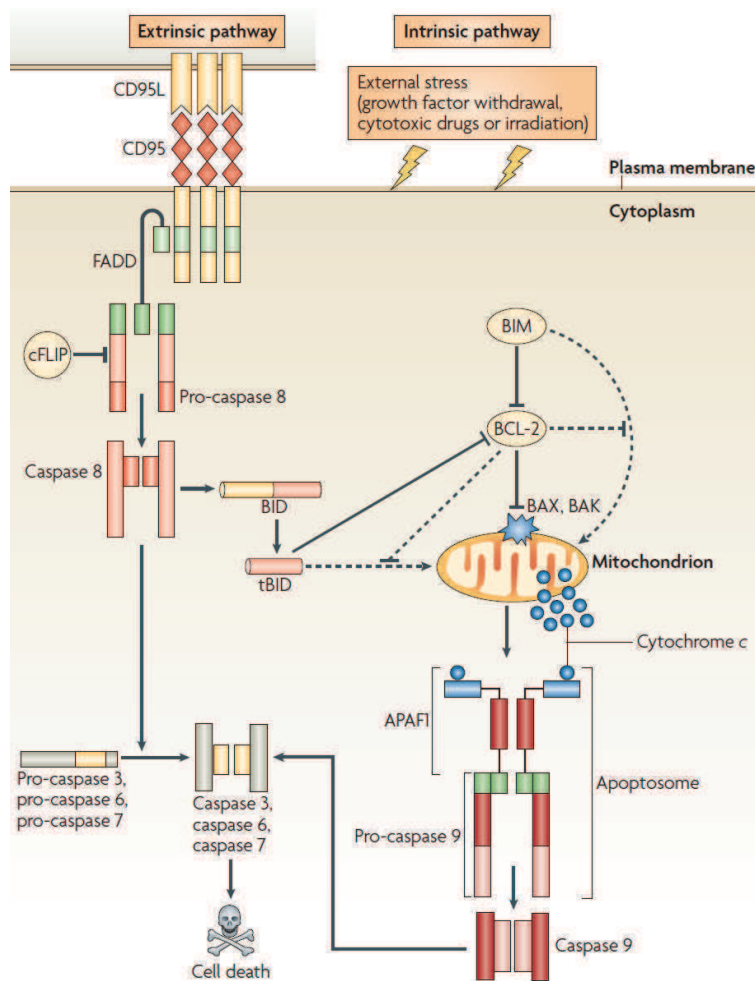


Figure 16 : Les voies de signalisation de l'apoptose. *Issu de (Bouillet and O'Reilly, 2009)*

Dans la voie extrinsèque (ou des récepteurs de mort), l'engagement du récepteur de mort CD95 par CD95 ligand (CD95L) conduit à l'activation de la caspase 8 par la protéine adaptatrice FADD domaine de mort associé à Fas). La caspase 8 activée clive et active les caspases 3, 6 et 7, qui visent les substrats cellulaires vitaux pour induire la mort cellulaire. Dans la voie intrinsèque, les signaux de stress externes comme la privation de facteurs de croissance, l'exposition à des agents cytotoxiques ou des rayonnements activent Bcl-2 mais également des médiateurs pro-apoptotique comme BIM, qui à son tour va activer BAX et BAK, soit directement (en pointillé) ou indirectement (trait plein) en inhibant les membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2. L'oligomérisation des protéines BAX et BAK provoque la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, la libération de cytochrome c et l'activation de la caspase 9 initiateur de l'apoptosome. La caspase 9 effectrice va alors activer les caspases 3, 6 et 7 et cela aboutit finalement à la mort cellulaire. Le clivage de BID par la caspase 8 après l'induction de CD95 fait un lien entre les deux voies dans certains types de cellules (par exemple, dans les hépatocytes). APAF1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1); cFLIP (Cellular FLICE-Like Inhibitory protein); tBID (BID tronqué).

Une diminution du nombre de Tregs du fait d'une apoptose augmentée a souvent été associée à des pathologies auto-immunes (Glisic-Milosavljevic et al., 2007; Nakano et al., 2007; Orihara et al., 2007). Ces résultats suggèrent que les Tregs subissent une mort cellulaire différente de celle des autres LTs ou alors qu'ils dépendent de facteur de survie ou de mort différents des LTconvs. Bien qu'il ait été observé une augmentation du nombre de Tregs dans les souris déficientes pour l'expression des facteurs pro-apoptotiques Bim (Chougnet et al.,

2011) ou Bax et Bak (Zhan et al., 2011), ces résultats traduisent essentiellement un défaut de sélection négative et non pas une meilleure survie des Tregs en périphérie. Le candidat préférentiel impliqué dans la survie des Tregs a longtemps été Bcl-2, car son rôle potentiel été suggéré par plusieurs études. *In vitro*, lorsque des Tregs sont mis en culture en présence d'IL-2, l'expression de Bcl-2 est augmentée (Taams et al., 2001). De plus, les souris dans lesquelles Bcl-2 est exprimé de façon constitutive, le nombre de Tregs est également augmenté (Tischner et al., 2012). En revanche, une étude récente montre que, lorsque des souris sont irradiées puis reconstituées par un mélange de précurseurs hématopoïétiques issus de souris WT et de souris Bcl-2^{-/-}, elles présentent un taux normal de Tregs issus des précurseurs Bcl-2^{-/-} (Pierson et al., 2013). Ces résultats suggèrent que Bcl-2, bien que jouant un rôle dans l'apoptose des Tregs, ne serait pas un facteur critique.

Dans cette même étude, l'équipe d'Adrian Liston montre que Mcl-1 est le facteur anti-apoptotique crucial dans l'homéostasie des Tregs. En effet, ils observent que les souris *Foxp3^{cre} Mcl-1^{flox/flox}*, où le gène *Mcl-1* floxé est éliminé dans les cellules exprimant la protéine Cre recombinase qui est sous le contrôle de l'expression de Foxp3, succombent entre 4 et 8 semaines à de multiples pathologies auto-immunes, présentent une diminution d'environ 60% du nombre de Tregs en périphérie. Ils démontrent également que des souris irradiées et reconstituées avec de la moelle osseuse de souris WT et de souris *CreERT2 Mcl-1^{flox/flox}*, présentent un très faible taux de Tregs issus des précurseurs *CreERT2 Mcl-1^{flox/flox}*. CreERT2 est une protéine de fusion entre le récepteur humain à l'estrogène et la Cre recombinase. C'est un système inducible. En effet, l'injection du tamoxifène (ligand de ERT2) entraîne la translocation du récepteur dans le noyau et permet à la Cre recombinase d'éliminer le gène floxé. Enfin, ils montrent qu'*in vitro* et *in vivo* la régulation de l'expression de Mcl-1 passe par l'IL-2 (Pierson et al., 2013). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que l'homéostasie des Tregs est régulée par l'IL-2 et par les molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1.

Outre la voie intrinsèque, l'apoptose peut être déclenchée dans les LTs via des interactions récepteurs-ligands. En effet, les LTs expriment plusieurs récepteurs de mort différents : le récepteur Fas (CD95) en l'est d'entre eux. Un défaut dans la voie des récepteurs de mort n'entraîne pas d'augmentation du nombre de Tregs (Ikeda et al., 2010; Zheng et al., 2007a) et les Tregs semblent être moins susceptibles à l'induction de la mort via Fas que les LTs effecteurs (Banz et al., 2002; Fritzsche et al., 2005). Toutefois, d'autres études ont montré qu'une déplétion spécifique des Tregs pouvait être réalisée par l'activation de Fas via FasL (Chen et al., 2007a; Reardon et al., 2008). Enfin, d'autres résultats indiquent que les Tregs

sont moins sensibles à l'AICD (Activation-Induced Cell Death) déclenchée par Fas lors de l'activation. En effet, contrairement aux LTs activés, les Tregs expriment peu FasL car Foxp3 réprime l'expression de FasL lors de l'activation et limite ainsi l'AICD (Weiss et al., 2011).

6. Stabilité et plasticité des Tregs

De nos jours, la plasticité des Tregs fait beaucoup débat dans la communauté scientifique. Les LTs peuvent acquérir différents phénotypes et différentes fonctions selon les conditions environnementales et les Tregs sont également sujet à ces variations environnementales. Il a été suggéré que les Tregs sont instables sous certaines conditions et qu'ils peuvent adopter un phénotype similaire à celui des LTs CD4⁺ effecteurs. En effet, des Tregs transférés dans un hôte lymphopénique perdent l'expression de Foxp3 et de CD25, cela entraînant leur conversion en LTs CD4⁺ effecteurs. De plus, ces « exTregs » produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ et le TNF α . Cependant, cette perte d'expression peut être évitée par le co-transfert de LTconvs, ces derniers fournissant alors l'IL-2 nécessaire au maintien de l'expression de Foxp3 (Duarte et al., 2009).

Le groupe de Shohei Hori propose qu'en condition physiologique, il existe une sous-population de Tregs CD25^{-/faible} plus instable parmi le pool de Tregs (Komatsu et al., 2009). L'équipe a renforcé cette théorie en utilisant des souris Foxp3^{GFPCre}Rosa26^{RFP} : ces souris permettent de déterminer quelle cellule a exprimé Foxp3 au cours de son existence et a prouvé qu'une fraction des Tregs devient Foxp3⁻ et s'accumule en conditions inflammatoires. De plus, les auteurs démontrent que cette reprogrammation est due à l'absence d'hypométhylation de la région CNS2 du promoteur de Foxp3 (Miyao et al., 2012). Toutefois, l'équipe d'Alexander Rudensky avait démontré en 2010, dans un système similaire utilisant cette fois-ci des souris Foxp3^{GFPCre}Rosa26^{YFP}, qu'une fraction, inférieure à 3%, de Tregs perdait l'expression de Foxp3, suggérant que le lignage des Tregs était très stable même en conditions inflammatoires (Rubtsov et al., 2010).

D'autres études ont analysé la plasticité des Tregs en conditions inflammatoires. Par exemple, les Tregs peuvent se différencier *in vitro* en LTs Th17 en présence d'IL-6 et de TGF β (Yang et al., 2008). *In vivo*, une diminution de l'expression de Foxp3 a été observée dans les Tregs présents dans l'environnement tumoral (Sharma et al., 2010) mais également lors d'une infection par *Taxoplasma Gondii*. En effet, dans ce type d'infection, une diminution d'IL-2 dans l'intestin induit la perte d'expression de Foxp3 dans les Tregs et entraîne l'acquisition d'un phénotype effecteur par ces Tregs, notamment l'expression de T-bet et la production

d'IFN γ (Oldenhove et al., 2009). Tous ces résultats suggèrent que la stabilité du lignage Tregs est dépendante de la stabilité de l'expression de Foxp3 et de CD25.

Les mécanismes permettant une expression stable de Foxp3 peuvent être décomposés en 3 niveaux de régulation. Premièrement, Foxp3 induit sa propre induction (Gavin et al., 2007) qui est également favorisé par le CD25 et l'activation de STAT5 (Antov et al., 2003; Zheng et al., 2007b). De plus, Foxp3 régule négativement les autres voies de différenciation des LTs, tout en réprimant l'expression des cytokines associées aux autres lignages (Gavin et al., 2007; Wan and Flavell, 2007).

Dans un second temps, des modifications épigénétiques, dans la région TSDR du gène *Foxp3* doivent être initiées pour permettre une expression stable de Foxp3 (Floess et al., 2007). En effet, quand le locus *Foxp3* est déméthylé par un traitement à l'azacytidine, une simple activation est suffisante pour induire l'expression de Foxp3 (Polansky et al., 2008). Dans les nTregs, Foxp3 lui-même, en coopération avec le facteur de transcription Runx1, ne se lie à la région TSDR que si celle-ci est déméthylée. Ces résultats montrent que la forme déméthylée de la région TSDR permet de recruter le complexe Runx-Foxp3 pour induire la transcription de *Foxp3*. La délétion de cette région entraîne une perte d'expression de Foxp3 au cours de divisions successives (Zheng et al., 2010). Enfin, cette région déméthylée est riche en îlots CpG, servant de site de fixation à d'autres facteurs de transcription comme CREB/ATF, NF κ B et Ets-1, qui agissent en aval des signaux TCR/CD28 et permettent une stabilisation de l'expression de Foxp3 (Kim and Leonard, 2007; Mouly et al., 2010; Polansky et al., 2010). Enfin en 2012, l'équipe de Shimon Sakaguchi révèle l'épigénome des Tregs. Dans cette étude, le statut de méthylation des îlots CpG des gènes clefs associés aux Tregs a été analysé. Il démontre que l'acquisition au niveau thymique et la stabilité au niveau périphérique du lignage des Tregs est dépendante du signal TCR, car il induit la déméthylation de ces îlots et permet la transcription des gènes-clefs définissant le lignage des Tregs (Ohkura et al., 2012).

Un troisième mécanisme de stabilité des Tregs est médié par les microRNA, mais il est encore mal défini. Les souris déficientes pour les enzymes Dicer ou Drosha, des enzymes indispensables à la génération des microRNA, développent des maladies auto-immunes fatales semblables à celles qui sont observées chez la souris déficientes en Tregs (Chong et al., 2008; Liston et al., 2008a). Les Tregs des souris Dicer^{-/-} sont moins fonctionnels en conditions physiologiques et perdent totalement leurs capacités suppressives en conditions inflammatoires (Liston et al., 2008a). Cela est dû à la perte d'un groupe de microRNAs (miR-

7, miR-18a, miR-21, miR-34a et miR-155) qui inhibent SATB1 et miR-146a qui, à leur tour, suppriment l'expression de STAT1. En effet, la répression de SATB1 permet un remodelage correct de la chromatine pour l'expression des gènes nécessaires aux Tregs (Beyer et al., 2011). De plus, la répression de STAT1 évite la transformation des Tregs en LTs Th1 producteurs d'IFN γ en conditions inflammatoires (Lu et al., 2010). Enfin, il a également été montré que Foxp3 dirige l'expression du microRNA miR-155 et, ainsi, inhibe l'expression de SOCS1 qui est un inhibiteur de la voie de signalisation du récepteur à l'IL-2 (Lu et al., 2009).

Pris ensemble, ces trois processus de régulation permettent de stabiliser et verrouiller le lignage des Tregs en conditions homéostatiques.

Problématique

Des études récentes ont clairement établi que le TCR avait un rôle important dans l'engagement des thymocytes vers la lignée des Tregs (Bautista et al., 2009). Plus précisément, le développement des Tregs serait instruit par un TCR ayant une forte avidité pour les peptides du soi associés aux molécules du CMH de classe II présentés dans le thymus. Durant leur développement, les Tregs expriment le facteur de transcription Foxp3 qui induit et stabilise un programme spécifique pour leurs fonctions suppressives.

Après leur maturation dans le thymus, les Tregs migrent à la périphérie où ils exercent leur pouvoir régulateur. En périphérie, des travaux ont suggéré que les Tregs continuaient d'interagir avec le soi (Darrasse-Jeze et al., 2009; Lathrop et al., 2008). Ainsi, nous avons voulu étudier le rôle de ces interactions continues avec le soi dans l'homéostasie et les fonctions suppressives des Tregs périphériques. Afin de réaliser cette étude, nous avons utilisé deux modèles expérimentaux, un modèle de chimère de moelle osseuse et un modèle de transfert adoptif permettant de priver, dans les deux cas, les Tregs d'interactions avec les molécules du CMH de classe II à la périphérie.

Dans la littérature, plusieurs études ont mis en évidence l'existence de différentes sous-populations de Tregs aux capacités suppressives différentes. Très récemment, notre équipe a démontré que l'expression de Ly-6C permettait de discriminer les LTnaïfs selon leur autoréactivité (Martin et al., 2013). Nous avons également révélé, dans des souris non manipulées, que l'expression de la protéine Ly-6C permet d'identifier deux sous-populations de Tregs présentant une autoréactivité différente. Ainsi, dans la seconde partie de mes travaux de thèse, je me suis intéressé à caractériser les Tregs Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ et plus particulièrement à étudier l'impact de leur autoréactivité sur leur développement, leurs fonctions suppressives et leur homéostasie.

Le but de l'ensemble de mes travaux de thèse était donc de comprendre l'impact de l'autoréactivité dans la biologie des Tregs périphériques. Plus précisément, je me suis attaché à mettre en évidence le rôle fondamental que joue la reconnaissance du soi dans les capacités suppressives des Tregs périphériques.

RESULTATS

Article 1 :

Foxp3-independent loss of regulatory CD4⁺ T-cell suppressive capacities induced by self-deprivation.

Eur J Immunol. 2012 May ;42(5)1237-49

Arnaud Delpoux, Maud Poitrasson-Rivière, Armelle Le Campion, Arnaud Pommier, Philippe Yakonowsky, Sébastien Jacques, Franck Letourneur, Clotilde Randriamampita, Bruno Lucas*, Cédric Auffray*.

À la périphérie, l'expression de Foxp3 est considérée comme suffisante au maintien des fonctions suppressives des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs. En effet, chez les chimères hématopoïétiques où l'expression des molécules de CMH de classe II est restreinte à l'épithélium thymique, les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs périphériques sont dépourvus d'activité suppressive. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs périphériques récupérés 5 jours après transfert dans un hôte n'exprimant pas les molécules du CMH de classe II ne sont pas capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels à la fois *in vitro* et *in vivo*. La perturbation des interactions TCR/CMH de classe II conduit rapidement à l'altération du phénotype, de leur capacité à répondre à une stimulation, de la production d'IL-10 et de leur signature transcriptionnelle des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs. De façon intéressante, la privation de ces interactions n'affecte pas l'expression de Foxp3, indiquant que la reconnaissance de soi par les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs induit une signature transcriptionnelle et des caractéristiques fonctionnelles uniques qui ne reposent pas sur l'expression de Foxp3.

Foxp3-independent loss of regulatory CD4⁺ T-cell suppressive capacities induced by self-deprivation

Arnaud Delpoux^{1,2,3}, Maud Poitrasson-Rivière^{1,2,3},
Armelle Le Campion^{1,2,3}, Arnaud Pommier^{1,2,3}, Philippe Yakonowsky^{1,2,3},
Sébastien Jacques^{1,2,3}, Franck Letourneur^{1,2,3}, Clotilde
Randriamampita^{1,2,3}, Bruno Lucas^{*1,2,3} and Cédric Auffray^{*1,2,3}

¹ CNRS UMR8104, Cochin Hospital, Paris, France

² INSERM U567, Cochin Hospital, Paris, France

³ Paris Descartes University, Cochin Hospital, Paris, France

In the periphery, Foxp3 expression is considered sufficient to maintain natural regulatory CD4⁺ T-cell suppressive function. In this study, we challenge this model. Indeed, in mouse chimeras in which major histocompatibility complex (MHC) class II expression is restricted to the thymus, peripheral regulatory CD4⁺ T cells lack suppressive activity. In addition, regulatory CD4⁺ T cells recovered 5 days after transfer into recipient mice lacking expression of MHC class II molecules (self-deprived) are unable to inhibit the proliferative response of conventional CD4⁺ T cells both in vitro and in vivo. Disruption of TCR/MHC class II interactions rapidly leads to alterations in the regulatory CD4⁺ T-cell phenotype, the ability to respond to stimulation and to produce interleukin-10, and the transcriptional signature. Interestingly, self-deprivation does not affect Foxp3 expression indicating that in regulatory CD4⁺ T cells, self-recognition induces unique transcriptional and functional features that do not rely on Foxp3 expression.

Keywords: Autoreactivity • Foxp3 • Regulatory T cells



Supporting Information available online

Introduction

Naturally occurring regulatory CD4⁺ T (Treg) cells are important for the maintenance of self-tolerance in the periphery. In particular, they are key players in the prevention of various autoimmune and inflammatory disorders. Natural Treg cells arise in the thymus where T-cell receptor (TCR) signals lead to interleukin (IL)-2 sensitivity enhancement in developing thymocytes. Then, IL-2 signaling induces Foxp3 expression that, in turn, strengthens Treg-cell lineage stability [1,2]. Foxp3 expression is

then important to maintain a distinct transcriptional program required for their suppressive function [3–5].

Recent studies have clearly established that the TCR has an instructive role in inducing commitment of developing thymocytes into the Treg-cell lineage [6,7]. More precisely, Treg-cell development would be instructed by TCRs with high avidity for self-peptides bound to major histocompatibility complex (MHC) class II molecules (self). Indeed, the proportion of Treg cells is increased when TCR transgenic T cells are forced to see their cognate antigens in the thymus [1,2,8,9]. This model is further supported by the observation that there is a limited amount of

Correspondence: Dr. Bruno Lucas
e-mail: bruno.lucas@inserm.fr

*These authors contributed equally to this work.

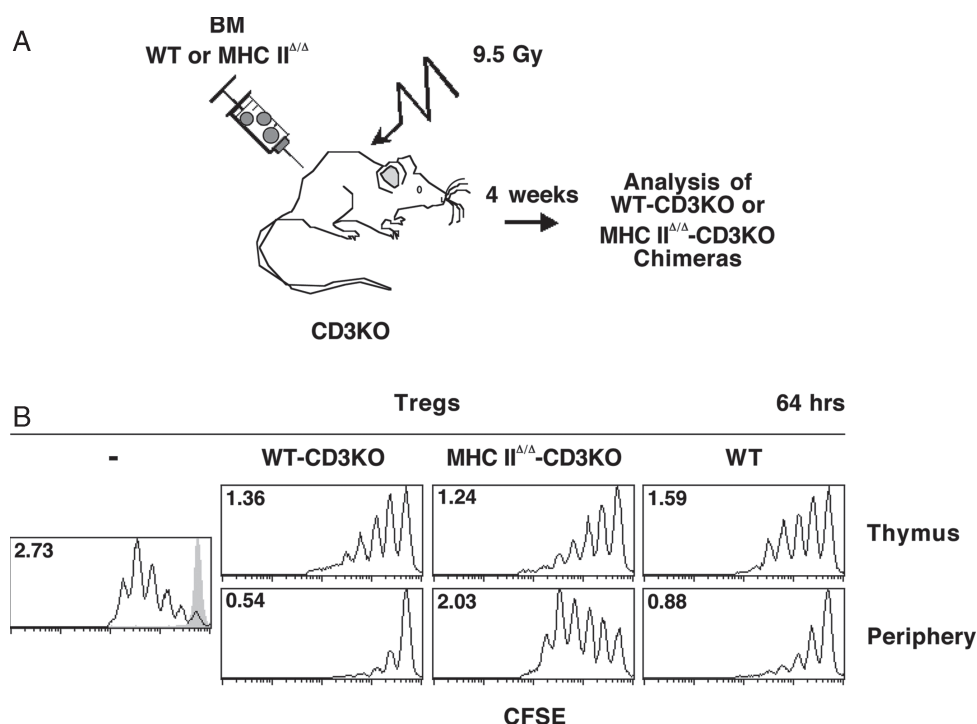


Figure 1. Major histocompatibility complex (MHC) II $^{\Delta/\Delta}$ -CD3KO chimeras lack functional Treg cells in the periphery. CD3KO mice were lethally irradiated and their immune system reconstituted with wild-type (WT) (WT-CD3KO chimeras) or MHC II $^{\Delta/\Delta}$ (MHC II $^{\Delta/\Delta}$ -CD3KO chimeras) bone marrow (BM) cells. Chimeras were analyzed 28 days after BM-cell transfer. (A) Diagram illustrating the experimental model. (B) CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ (Treg) cells were purified from the periphery or the thymus of chimeras and WT mice. CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ (Tconv) cells were purified from lymph nodes of WT mice, labeled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), and cultured alone (-) or together with the indicated Treg cells at a 1/1 Treg/Tconv cell ratio. CFSE fluorescence histograms of Tconv cells (CFSE $^{+}$) are shown 64 h after the beginning of culture. Histograms in the absence of anti-CD3 stimulation are also shown (left, filled histograms). Values correspond to the average number of cell divisions undergone by Tconv cells in response to anti-CD3 stimulation during the culture period. The histograms shown were generated from one experiment but are representative of three individual experiments.

overlap (10–20%) between the TCR sequences expressed within the conventional CD4 $^{+}$ T (Tconv) cell and the Treg-cell repertoire [10]. Interestingly, overlapping is more important when the Treg-cell repertoire was compared with the repertoire of pathogenic autoreactive effector T cells [11].

After migrating to the periphery, Treg cells still interact with self. Indeed, based on autoimmune ovarian disease and prostatitis models, Tung and colleagues [12, 13] have determined that continuous interactions with self are required to allow Treg cells to accumulate in the draining lymph-nodes. More recently, Lathrop et al. [14] have confirmed that the Treg-cell TCR repertoire varies by anatomical location in the periphery. Finally, Darrasse-Jèze et al. [15] have obtained interesting data showing that MHC class II-expressing dendritic cells are required to maintain Treg-cell numbers in the periphery. Altogether, these data strongly suggest that natural Treg cells are submitted to continuous interactions with self in the periphery.

In this study, we investigated whether self-deprivation (induced in our experimental settings by the nonexpression of MHC class II molecules in the periphery) would alter peripheral Treg-cell suppressive capacities. By using two complementary mouse experimental models, we show that self-deprived Treg cells lack

suppressive activity. Interestingly, self-deprivation does not affect Foxp3 expression indicating that in Treg cells, self-recognition induces unique transcriptional and functional features that do not rely on Foxp3 expression.

Results

Self-deprived Treg cells are not functional

To assess the role of interactions with self in the suppressive capacities of peripheral Treg cells, we first studied mouse bone-marrow (BM) chimeras in which MHC class II expression was restricted to the thymus (Fig. 1A). When MHC class II expressing BM cells were injected, the resulting chimeras (WT-CD3KO chimeras) displayed a pattern of MHC class II molecule expression similar to that of unmanipulated wild-type (WT) mice. In chimeras generated by injecting BM cells that did not express MHC class II molecules into recipient mice (MHC II $^{\Delta/\Delta}$ -CD3KO chimeras), MHC class II molecule expression was mostly restricted to radioresistant thymic epithelial cells [16]. In these chimeras, CD4 $^{+}$ T cells, notably Treg cells, were produced in the thymus even more efficiently than in

WT-CD3KO chimeras, due to the lack of efficient thymic negative selection by BM-derived antigen-presenting cells (APCs) in the thymic medulla [16]. Four weeks after BM cell transfer, the proportion of peripheral CD4⁺ T cells expressing Foxp3 was more important in WT-CD3KO chimeras than in MHC II^{Δ/Δ}-CD3KO chimeras (26.3 ± 0.8% in WT-CD3KO chimeras versus 16.8% ± 1.0 in MHC II^{Δ/Δ}-CD3KO chimeras).

We compared the *in vitro* suppressive capacities of thymic and peripheral Treg cells from both types of chimeras. Thymic Treg cells from MHC II^{Δ/Δ}-CD3KO chimeras inhibited Tconv-cell proliferation to a similar extent than thymic Treg cells from WT-CD3KO chimeras or from WT mice (Fig. 1B). By contrast, peripheral Treg cells from MHC II^{Δ/Δ}-CD3KO chimeras failed to efficiently suppress the proliferative response of Tconv cells to anti-CD3 stimulation. Thus, in MHC II^{Δ/Δ}-CD3KO chimeras, Treg cells are losing their functional characteristics when migrating from the thymus (MHC II⁺) to the periphery (MHC II⁻).

Then, we transferred large numbers of total T cells from the periphery of WT mice into CD3ε^{-/-} recipient mice lacking or not MHC class II molecule expression (CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} or CD3KO-MHC II⁺ recipient mice, respectively; Fig. 2A). Five days later, peripheral Treg cells were purified and their suppressive capacities tested *in vitro* (Fig. 2B–F).

As soon as 16 h after the beginning of culture, Treg cells from MHC II⁺ recipient mice or from WT mice inhibited the expression of late-activation markers by Tconv cells (increase in cell size and expression of CD25; Fig. 2B). By contrast, Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice were not able to suppress the activation of Tconv cells in response to anti-CD3 stimulation *in vitro*. These results were further confirmed when the suppressive capacities of Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} and CD3KO-MHC II⁺ recipient mice were studied 64 h after the beginning of the coculture (Fig. 2C). Indeed, at that time point, Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice failed to efficiently suppress the proliferative response of Tconv cells to anti-CD3 stimulation. The lack of efficient inhibition of Tconv-cell activation and proliferation by Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice was found to apply for various Treg/Tconv-cell ratios (Fig. 2D). These results were found to be highly statistically significant when data from six independent experiments were pooled (Fig. 2E). In the above experiments, Treg cells were purified as CD25⁺ CD4⁺ T cells using magnetic beads (see Materials and methods and Supporting Information Fig. 1A). To exclude the possibility that contaminants in Treg cells purified from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice (activated CD25⁺ Foxp3⁻ CD4⁺ T cells for example) might explain our results, we repeated the suppression assay using Foxp3-GFP (where GFP is green fluorescent protein) mice and isolating Treg cells by flow cytometry sorting. Using this protocol, whatever the origin of Treg cells, purity was above 99% (Supporting Information Fig. 1B). Highly purified Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice were still not able to suppress the response of Tconv cells in response to anti-CD3 stimulation *in vitro* (Supporting Information Fig. 1C). Interestingly, whatever their origin and suppressive capacities, Treg cells exhibited a stable phenotype, still

expressing Foxp3 and CD25 after 3 days of coculture (Supporting Information Fig. 1D).

We injected large numbers of T cells in order to fill the periphery and to limit lymphopenia-induced proliferation (LIP) of injected T cells. Indeed, we have previously shown that when more than 50×10^6 CD4⁺ T cells were transferred into T-cell deficient recipient mice, their LIP was largely reduced [17]. However, although limited, lymphopenia-induced Treg-cell activation and proliferation still existed to a certain extent in CD3KO-MHC II⁺ recipient mice and led to improvement of their suppressive capacities as shown by their enhanced capacities to control Tconv-cell proliferation when compared with Treg cells purified directly from WT mice (Fig. 2D and E, Supporting Information Fig. 1).

The nonfunctionality of Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice was not due to increased cell death of these cells in our culture assay. Indeed, for all Treg/Tconv-cell ratios tested, 16 h after the beginning of culture, only slight differences in the proportion of Treg cells can be observed in the culture wells whatever the origin of Treg cells (Supporting Information Fig. 2).

To test whether this loss of function was definitive or could be reversed, Treg cells from both types of recipient mice were precultured for 2 days in the presence of anti-CD3 and APC, with or without IL-2, before testing their suppressive capacities (Fig. 2F). After preactivating them in the presence or absence of IL-2, Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice were as efficient as Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ recipient mice in suppressing the response of Tconv cells to anti-CD3 stimulation (Fig. 2F). Moreover, Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice did not recover their suppressive capacities when precultured for 2 days with IL-2 alone (Supporting Information Fig. 3). TCR signaling is thus necessary and sufficient to reverse the loss of suppressive function observed when Treg cells cannot interact with self.

Altogether, our data suggest that continuous interactions with self are required for maintaining the suppressive capacities of Treg cells. However, in CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice, CD4⁺ Tconv cells are also not receiving any TCR signals, which may result in environmental changes such as diminished *in vivo* IL-2 levels that may explain our data. To exclude this possibility, CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice were injected daily with 2×10^5 IU of IL-2 (Fig. 3). As described previously [18], WT mice injected 3 consecutive days with 2×10^5 IU of IL-2 exhibited increased proportion of Treg cells in the periphery and their Treg cells expressed significantly higher CD25 surface amounts but unchanged Foxp3 levels when compared with those of Treg cells from untreated mice (Fig. 3A). Treg cells from IL-2-treated CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice were still completely inefficient in inhibiting CD25 expression on CD4⁺ Tconv cells 16 h after the beginning of culture, and were only able to inhibit slightly the proliferation of CD4⁺ Tconv cells 64 h after the beginning of culture (Fig. 3B). In CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice, increased production of IL-2 by injected CD8⁺ Tconv cells may compensate for

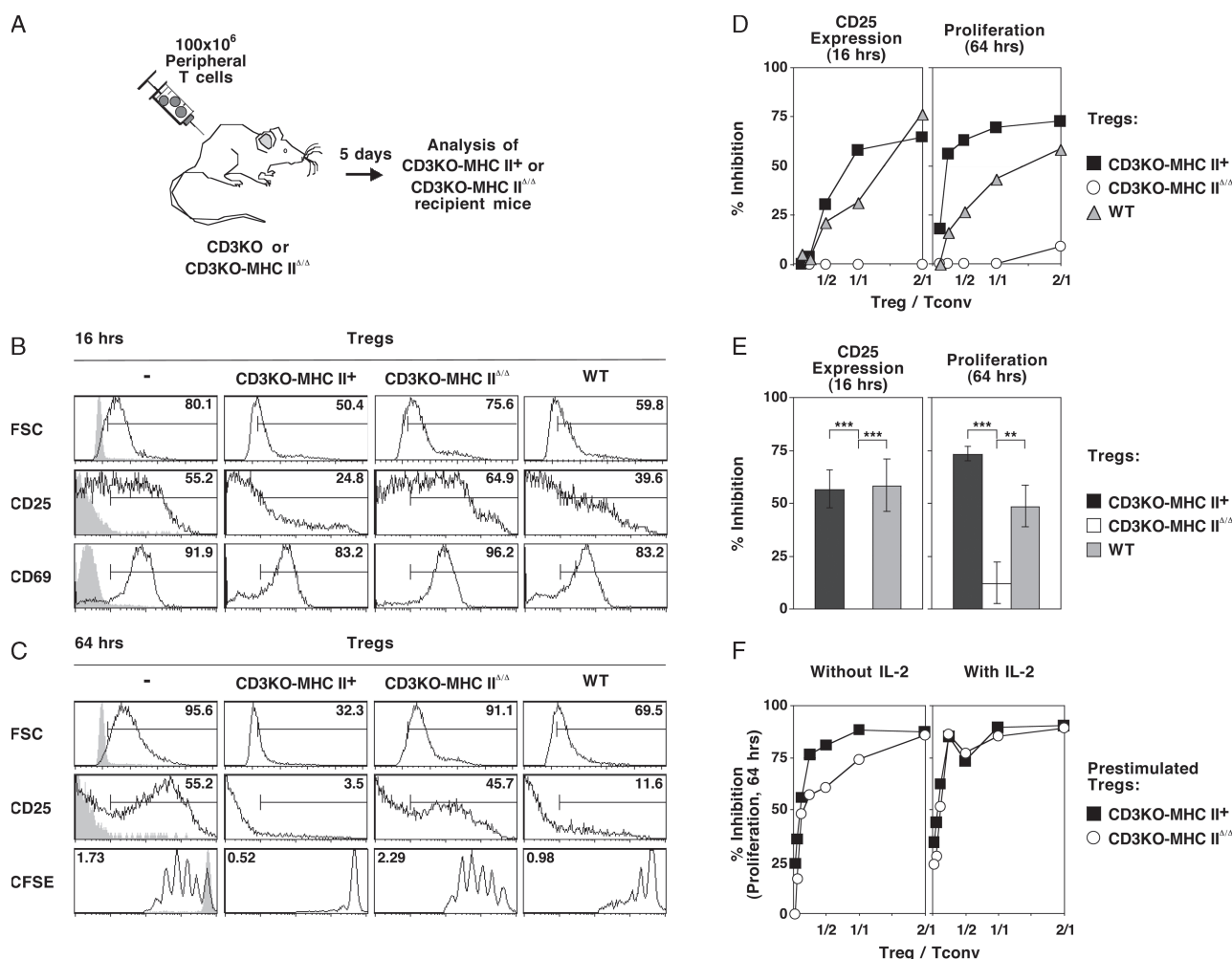


Figure 2. Self-deprived Treg cells are not functional in vitro. T cells purified from the periphery (lymph nodes + spleen) of WT mice were injected into CD3KO mice (CD3KO-MHC II⁺ recipients) or into CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} mice (CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipients). Five days later, the suppressive capacities of Treg cells purified from the periphery of recipient mice were analyzed. (A) Diagram illustrating the experimental model. (B) Tconv cells were purified from lymph nodes of WT mice, labeled with CFSE, and cultured alone (–) or together with the indicated Treg cells in the presence of soluble anti-CD3 and antigen-presenting cells (APCs). Forward Scatter (FSC), CD25, and CD69 histograms of Tconv cells (CFSE⁺) are shown 16 h after the beginning of culture for a 1/1 Treg/Tconv ratio. Histograms in the absence of anti-CD3 stimulation are shown as controls (left, filled histograms). (D) Inhibition indexes (inhibition of Tconv-cell CD25 expression was calculated after a culture period of 16 h; inhibition of Tconv-cell proliferation was estimated 64 h after the initiation of culture) are shown for various Treg/ Tconv-cell ratios (2, 1, 1/2, 1/4, 1/8). (E) The same inhibition indexes are shown for a 1/1 Treg/ Tconv-cell ratio as means \pm SEM values of six independent experiments. (F) Treg cells from the indicated mice were stimulated for 2 days with soluble anti-CD3 and APCs in the presence or absence of interleukin (IL)-2. Then, they were tested for their suppressive abilities. Data are shown as inhibition indexes of Tconv-cell proliferation after a culture period of 64 h are shown for various Treg/ Tconv-cell ratios (2, 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) and are representative of two individual experiments. ** p < 0.01, *** p < 0.001, Student's unpaired t -test.

“self-depriving” CD4⁺ Tconv cells (Fig. 3C). Moreover, as described previously [19], peripheral CD4⁺ Treg cells from MHC II^{Δ/Δ} mice (that are presumably selected on MHC class I molecules) were fully suppressive in vitro in spite of the virtual absence of CD4⁺ Tconv cells in these mice (Fig. 3D). Thus, in contrast with self-deprived Treg cells, CD4⁺ Tconv-cell deprived Treg cells are functional.

Finally, we tested whether self-deprived Treg cells were also lacking suppressive capacities in vivo. CD4⁺ Tconv cells (CD45.1)

were injected alone or together with Treg cells (CD45.2) from CD3KO-MHC II⁺, CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice or WT mice at a 1/1 ratio (Fig. 4A). Two weeks later, absolute numbers of CD4⁺ T cells recovered from the periphery of injected mice were estimated. As previously described [20], with such a ratio, control Treg cells significantly inhibited the initial expansion of CD4⁺ Tconv cells (Fig. 4B). In lines with our in vitro data, Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ recipient mice were more efficient than Treg cells purified directly from WT mice in inhibiting

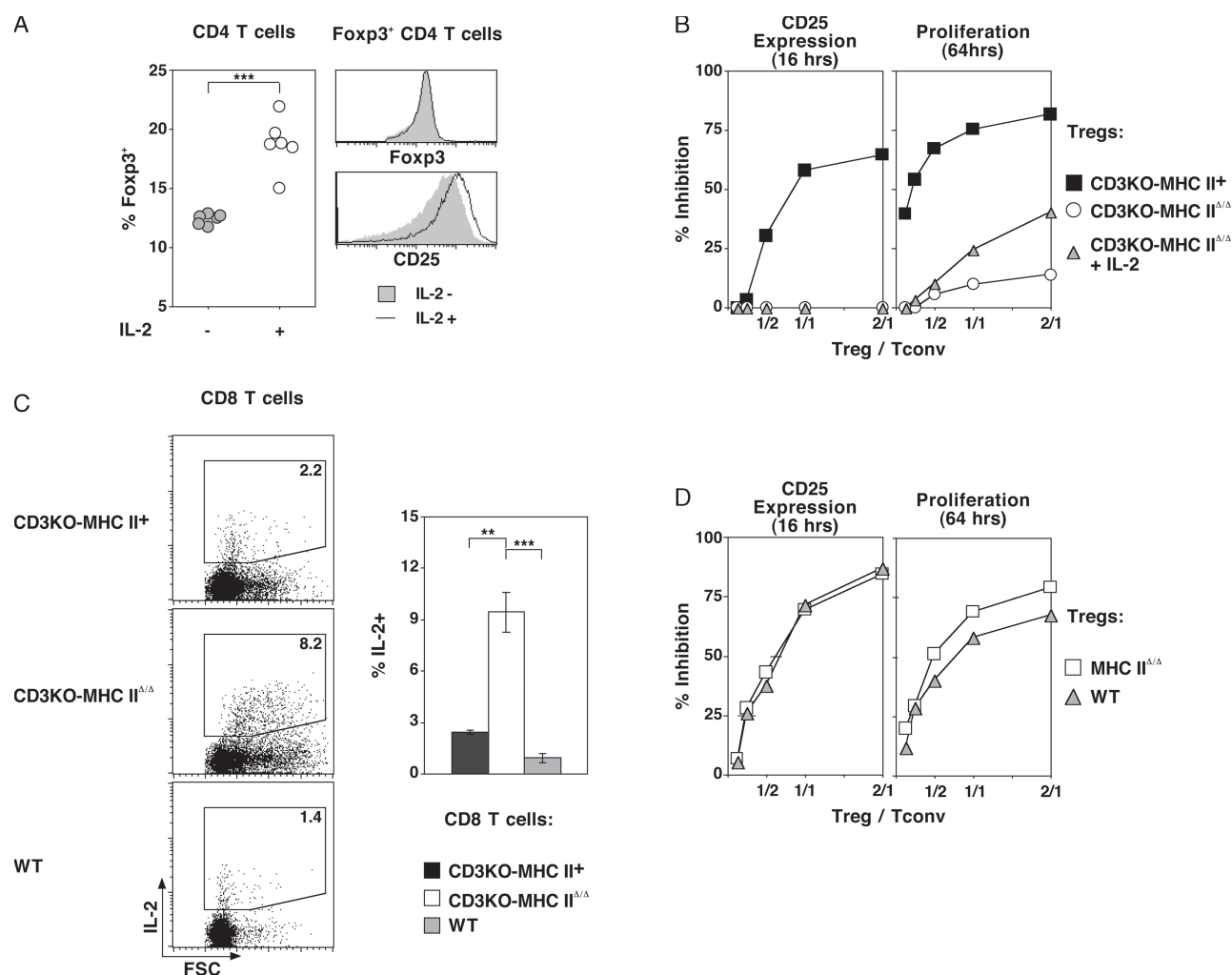


Figure 3. Decreased IL-2 production by Tconv cells does not account for self-deprived Treg-cell loss of suppressive function. (A) WT mice were treated 3 days with daily i.p. injections of 200,000 IU of recombinant human IL-2. Twenty-four h after the last injection, peripheral cells of treated and control mice were recovered and stained for CD4, CD8 α , CD25, and Foxp3 expression. The proportion of Foxp3-expressing cells among CD4⁺ CD8 α [−] cells was estimated. Foxp3 and CD25 fluorescence histograms of peripheral CD4⁺ CD8 α [−] Foxp3⁺ from IL-2-treated (IL-2+) or -untreated (IL-2−) WT mice are shown. Each symbol represents a single mouse (left). The histograms shown in the right part were generated from the data for one mouse, but are representative of six mice from two individual experiments. (B) CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice were daily injected or not with IL-2. Treg cells were purified from the periphery of CD3KO-MHC II⁺, CD3KO-MHC II^{Δ/Δ}, and IL-2-treated CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice. Tconv cells were purified from lymph nodes of WT mice, labeled with CFSE, and cultured alone or together with the indicated Treg cells at various Treg/Tconv-cell ratios, in the presence of soluble anti-CD3 and APCs. Data are shown as inhibition indexes for various Treg/Tconv-cell ratios (2, 1, 1/2, 1/4, 1/8) and are representative of two independent experiments. (C) Peripheral cells from CD3KO-MHC II⁺, CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice and WT mice were cultured for 2 h in the presence of phorbol myristate acetate (PMA), ionomycin, and brefeldin A. They were then stained for the surface expression of CD25, CD4, and CD8 α , and finally for intracellular IL-2. Representative FSC/IL-2 fluorescence dot-plots are shown. Percentages of IL-2-producing cells among CD4⁺ CD8 α ⁺ T cells are expressed as means \pm SEM values of six mice for two independent experiments. ** p < 0.01, *** p < 0.001, Student's unpaired t-test. (D) Treg cells were purified from the periphery of MHC II^{Δ/Δ} and WT mice. Tconv cells were purified from lymph nodes of WT mice, labeled with CFSE, and cultured alone or together with the indicated Treg cells in the presence of soluble anti-CD3 and APCs. Data are shown as inhibition indexes for various Treg/Tconv-cell ratios (2, 1, 1/2, 1/4, 1/8) and are representative of two independent experiments.

Tconv-cell proliferation in vivo. Interestingly, no significant difference was observed whether CD4⁺ Tconv cells were injected alone or together with Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice (Fig. 4B). This loss of function did not correlate with decreased numbers of Treg cells (Fig. 4C). Thus, self-deprived Treg cells are not functional both in vitro and in vivo.

Increased response to TCR stimulation of Treg cells deprived of self-recognition in vivo

Treg cells require antigen stimulation via their TCR to exert their suppressive function in vitro [21, 22]. Several studies have demonstrated that TCR contacts with self amplify naive T-cell

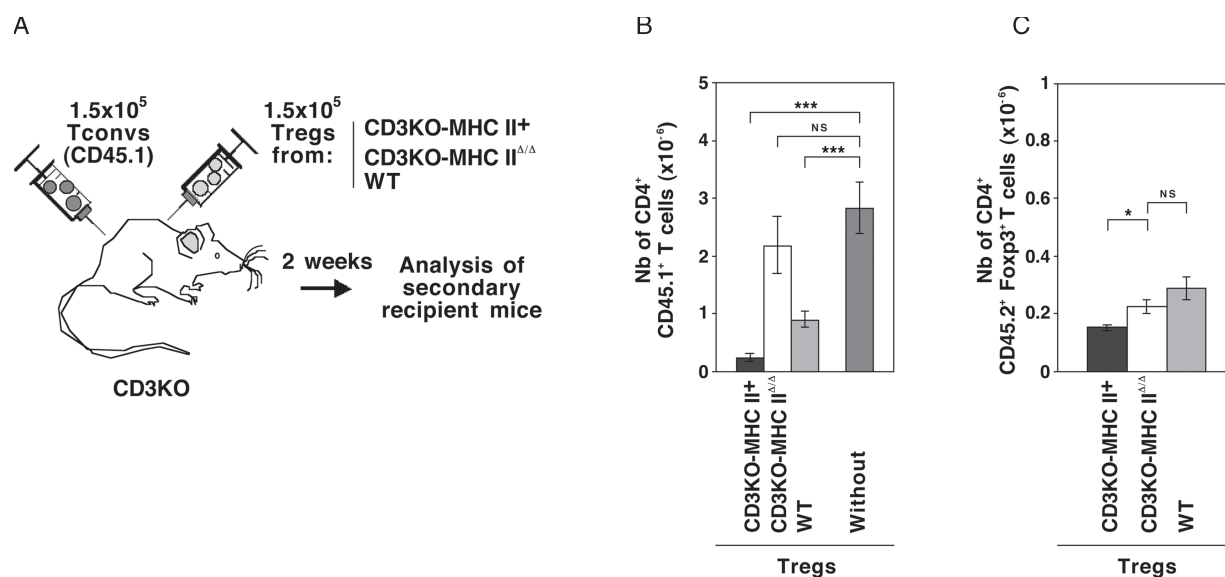


Figure 4. Self-deprived Treg cells are not functional in vivo. Purified lymph node CD4⁺ T cells from C57BL/6 CD45.1 mice were stained for CD44 and CD25 expression and naive CD4⁺ Tconv cells were sorted by flow cytometry. Naive CD4⁺ Tconv cells (CD45.1) were injected alone or together with Treg cells (CD45.2) from CD3KO-MHC II⁺, CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice or WT mice. Two weeks later, secondary recipient mice were sacrificed and peripheral cells were stained for CD4, CD8_α, T-cell receptor (TCR)-β, CD45.1, CD45.2, and Foxp3 expression. (A) Diagram illustrating the experimental model. (B) The absolute numbers of CD45.1⁺ CD4⁺ T cells in the periphery (pooled lymph node and spleen cells) were estimated. (C) The absolute numbers of CD45.2⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T cells in the periphery (pooled lymph node and spleen cells) were estimated. (B, C) Data are expressed as means ± SEM of *n* = 10 mice per group pooled from two individual experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, Student's unpaired *t*-test.

responsiveness to foreign antigens [23]. Thus, Treg cells recovered from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice may be less responsive to anti-CD3 stimulation than Treg cells from WT or CD3KO-MHC II⁺ recipient mice and this may explain their severely impaired suppressive capacities in vitro. To test this hypothesis, we compared the response of Treg cells from CD3KO-MHC II⁺, CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice or WT mice to anti-CD3 stimulation (Fig. 5). As already described [24], we found that, after TCR ligation, Treg cells mobilized intracellular calcium stores less efficiently than Tconv cells (Fig. 5A). Surprisingly, Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice displayed markedly increased TCR-induced calcium flux in comparison with Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ recipient mice or WT mice (Fig. 5A and B). Accordingly, a higher proportion of Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice up-regulated CD69 in response to anti-CD3 stimulation and resulting CD69⁺ cells expressed higher surface amounts of this activation marker when compared with that of Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ recipient mice or WT mice (Fig. 5C and D). Such an increased expression of CD69 by self-deprived Treg cells in response to stimulation was also observed when Treg cells were cocultured with Tconv cells (at a 1/1 ratio, after 16 h of culture, % CD69⁺ cells among Treg cells = 43 ± 10 for CD3KO-MHC II⁺ recipient mice, 79 ± 6 for CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice, and 61 ± 8 for WT mice).

Finally, 2 days after the beginning of culture, Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice (analysis was restricted to Foxp3-expressing cells) proliferated to a similar extent than Tconv cells (Fig. 5E and F). Although responding to anti-CD3 stimula-

tion more efficiently than did Treg cells from WT mice, Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ recipient mice cycled significantly less than self-deprived Treg cells (Fig. 5E).

Thus, in contrast with naive T cells, self-deprivation did not lead to a defect in Treg-cell ability to be activated by TCR signals. On the contrary, their response was found to be augmented and comparable with the response of Tconv cells in terms of calcium mobilization, CD69 upregulation and proliferation.

Self-deprivation alters the phenotype of Treg cells and their ability to produce IL-10

We compared the phenotype of self-deprived Treg cells with the phenotype of Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ recipient mice or WT mice. Numerous molecules are differentially expressed by Treg cells and Tconv cells (Fig. 6A, Supporting Information Fig. 4A). Expression of several of them including CD39, CD103, glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR), and CTLA-4 was found to be unaffected by self-deprivation (Supporting Information Fig. 4B). In contrast, self-deprived Treg cells overexpressed PDL1 and CD25 when compared with Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ recipient mice or WT mice. CD25 upregulation was even more pronounced 10 days after transfer (Fig. 6B). Interestingly, Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice exhibited lower levels of CD73 than Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ recipient mice or WT mice. CD73 is an ectoenzyme that

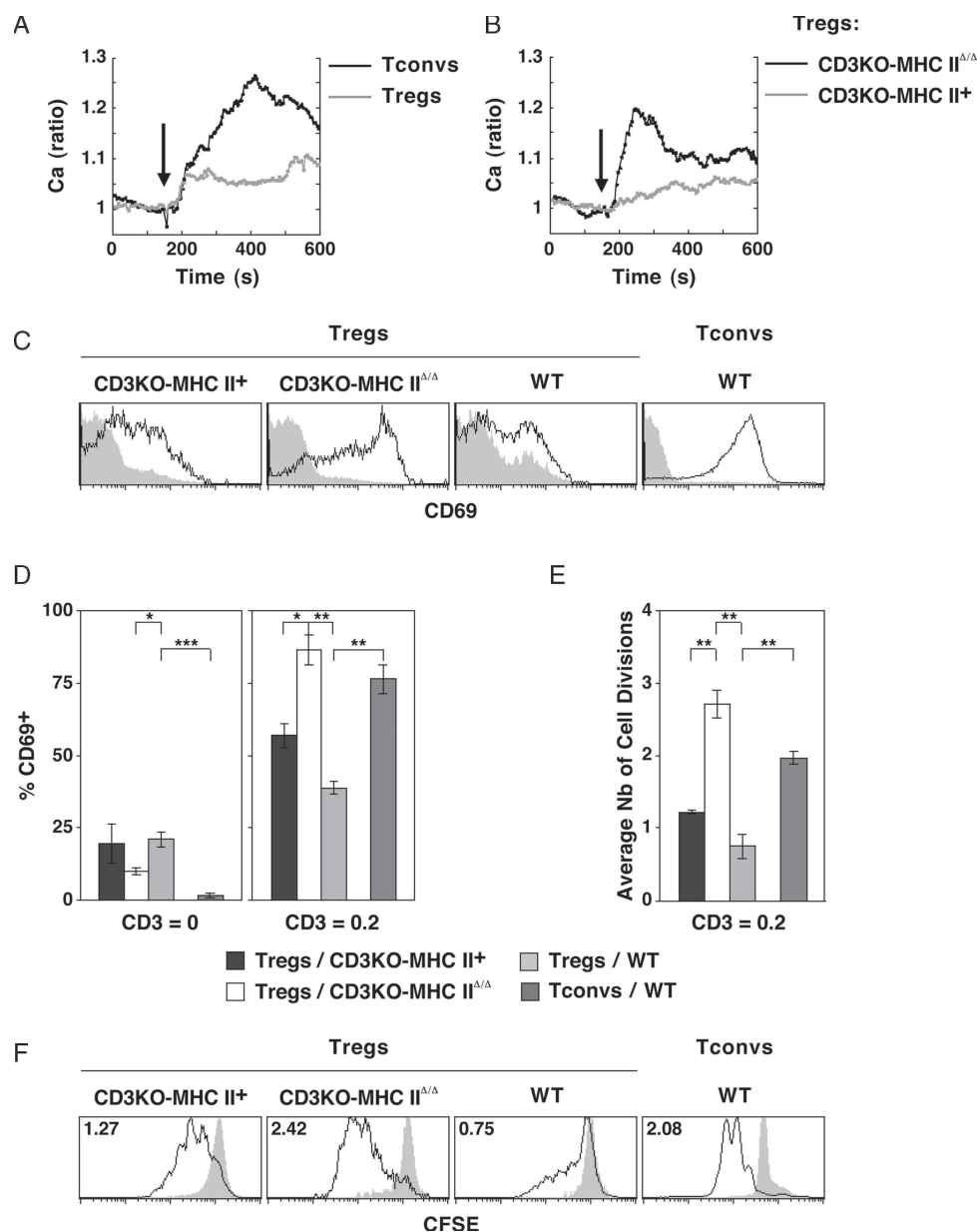


Figure 5. Efficient response of self-deprived Treg cells to TCR stimulation. (A) Example of calcium (Ca) mobilization after anti-CD3 stimulation (+150 s, arrow) in CD4⁺ CD25⁺ Treg cells and Tconv cells from WT mice. (B) Example of the average Ca response measured in Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ or CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice. (C) Purified Treg cells and Tconv cells were stimulated in the presence of soluble anti-CD3 and APCs. CD69 fluorescence histograms are shown 16 h after the beginning of culture. Histograms in the absence of anti-CD3 stimulation are shown as controls (filled histograms). (D) The percentage of CD69⁺ cells among Treg cells or Tconv cells was estimated after 16 h of culture. (E) Purified CFSE-labeled Treg cells and Tconv cells were stimulated in the presence of soluble anti-CD3 and APCs. After 48 h of culture, cells were stained for CD4, CD25, and Foxp3 expression, and the CFSE dilution induced by stimulation was estimated. The average number of cell divisions for each subset was then calculated. For Treg cells, analysis was restricted to Foxp3-expressing cells. (F) CFSE histograms are shown 48 h after the beginning of culture (For Treg cells, analysis was restricted to Foxp3-expressing cells). Histograms in the absence of anti-CD3 stimulation are shown as controls (filled histograms). (A–C, F) The histograms shown were generated from the data for one mouse, but are representative of mice from three individual experiments. (D, E) Results are expressed as means ± SEM values of three independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, Student's unpaired *t*-test.

catalyzes the generation of adenosine and its activity has been associated with Treg-cell suppressive capacities *in vitro* [25]. CD73 surface amounts on self-deprived Treg cells decreased over time. Indeed, CD73 surface expression on Treg cells was nearly com-

pletely lost 10 days after transfer into MHC II deficient mice (Fig. 6B). Other molecules have been shown to be involved in the *in vitro* Treg-cell suppressive capacities such as galectin-1, IL-35 (EBI3 + IL-12p35), transforming growth factor (TGF)-β, and

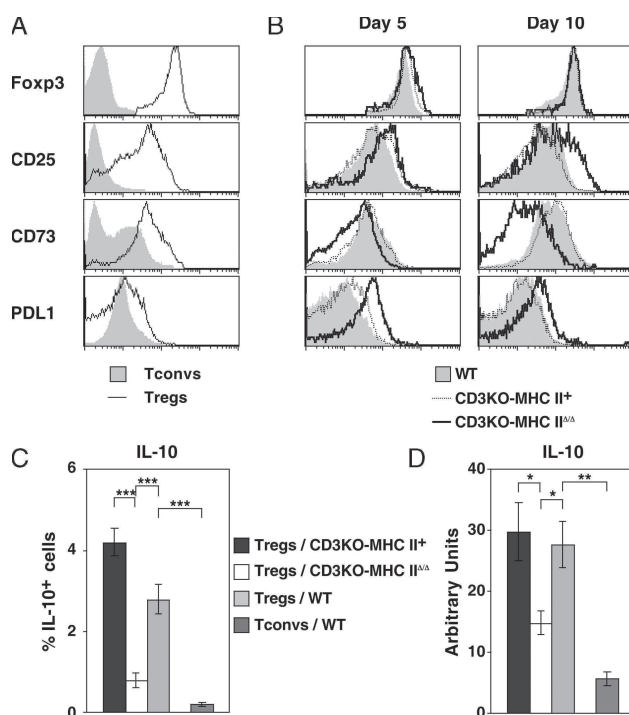


Figure 6. Altered phenotype and cytokine production of self-deprived Treg cells. (A) Foxp3, CD25, CD73, and PDL1 fluorescence histograms of peripheral CD4⁺ CD8_α[−] Foxp3⁺ (Treg cells; solid line histogram) and CD4⁺ CD8_α[−] Foxp3[−] (Tconv cells; filled histogram) cells are shown for WT mice. (B) The expression of these markers is shown for peripheral Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ (dotted line histogram) and CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} (bold line histogram) recipient mice 5 and 10 days after transfer as well as from WT mice (filled histogram). The histograms shown were generated from the data for one mouse, but are representative of three individual experiments with three mice per group. (C) Peripheral cells were cultured for 2 h in the presence of PMA, ionomycin, and brefeldin A. They were then stained for the surface expression of CD25, CD4, and CD8_α, and finally for intracellular IL-10. Percentages of cytokine-producing cells among Treg cells (CD25⁺) are shown for CD3KO-MHC II⁺ and CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice 5 days after transfer, and WT mice. Data obtained with Tconv cells (CD25[−]) purified from the periphery of WT mice are also shown. Data are mean \pm SEM values of nine mice pooled from three independent experiments. (D) The transcript levels of IL-10 were analyzed by qRT-PCR in the indicated CD4⁺ T-cell subsets (5 days after transfer for recipient mice) and are shown as mean \pm SEM values of relative expression. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, Student's unpaired t-test.

granzyme B [25]. Expression of these molecules was not modified (or augmented) by self-deprivation (Supporting Information Fig. 4C).

It has been shown that decreased Foxp3 expression in the periphery causes defective suppressive function of Treg cells and their conversion into effector cells, which contribute to, rather than inhibit, autoimmune diseases [26,27]. Here, we found that Foxp3 expression was not affected by self-deprivation. Indeed, Treg cells from CD3KO-MHC II⁺, CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice as well as from WT mice expressed similar amounts of Foxp3 (Fig. 6B). Thus, self-deprivation leads to multiple alterations in

the phenotype of Treg cells with up- or downregulation of key suppressor molecules without affecting Foxp3 expression.

Then, we assessed the ability of Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ and CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice to produce the anti-inflammatory cytokine, IL-10 (Fig. 6C). Interestingly, Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice produced less IL-10 than Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ recipient mice or WT mice. Similar differences were observed at the mRNA level (Fig. 6D). Thus, lack of self-recognition events alters both the phenotype and cytokine production of Treg cells.

Self-deprivation alters Treg-cell transcriptional signature

To further compare self-deprived Treg cells with the fully functional Treg cells from CD3KO-MHC II competent mice, we obtained Affymetrix gene expression profiles from CD4⁺ CD25⁺ TCR⁺ cells directly isolated from the periphery of CD3KO-MHC II⁺ or CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice by flow cytometry sorting (Fig. 7). A total of 563 Affymetrix targets (representing 547 genes) were significantly differentially expressed (at a 1.5-fold cutoff) between the two types of Treg cells (263 overexpressed and 300 underexpressed in Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice, respectively, Supporting Information Fig. 5A).

Hill et al. have recently published a list of 603 Affymetrix targets (corresponding to 490 genes) defined as representing the peripheral Treg-cell transcriptional signature [28]. Comparison of our gene list with this Treg-cell signature revealed an overlap of 50 genes (14 genes downregulated in Treg cells when compared with Tconv cells; 36 upregulated; Fig. 7A and B). Interestingly, among the 14 genes defined by Hill et al. as downregulated in Treg cells, 11 (79%) were upregulated in Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice. Similarly, 32 of the 36 genes (89%) that are normally upregulated in Treg cells were downregulated in self-deprived Treg cells. These results were confirmed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) (Fig. 7C, Supporting Information Fig. 5B). Indeed, all of the 11 genes normally downregulated in Treg cells when compared with Tconv cells, and found to be more transcribed in CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} than in CD3KO-MHC II⁺ recipient mice were upregulated in self-deprived Treg cells nearly to the levels observed in Tconv cells from WT mice. Gene expression profiles were also obtained from peripheral Treg cells of MHC II^{Δ/Δ}-CD3KO and WT-CD3KO chimeras. Interestingly, microarray analysis of Treg cells from chimeras and adoptive transfers revealed overlapping results (Pearson's correlation: p < 0.0001; Supporting Information Fig. 5C). In particular, the expression of several genes of the Treg-cell signature (such as *pde3b*, *atp8b4*, and *klrd1*) was affected in both experimental models by self-deprivation. Thus, part of the Treg-cell transcriptional signature is abolished by self-deprivation.

The expression of approximately one-third of the 490 genes of the Treg-cell signature correlates with Foxp3 expression or exhibits the strong negative correlation expected for genes repressed

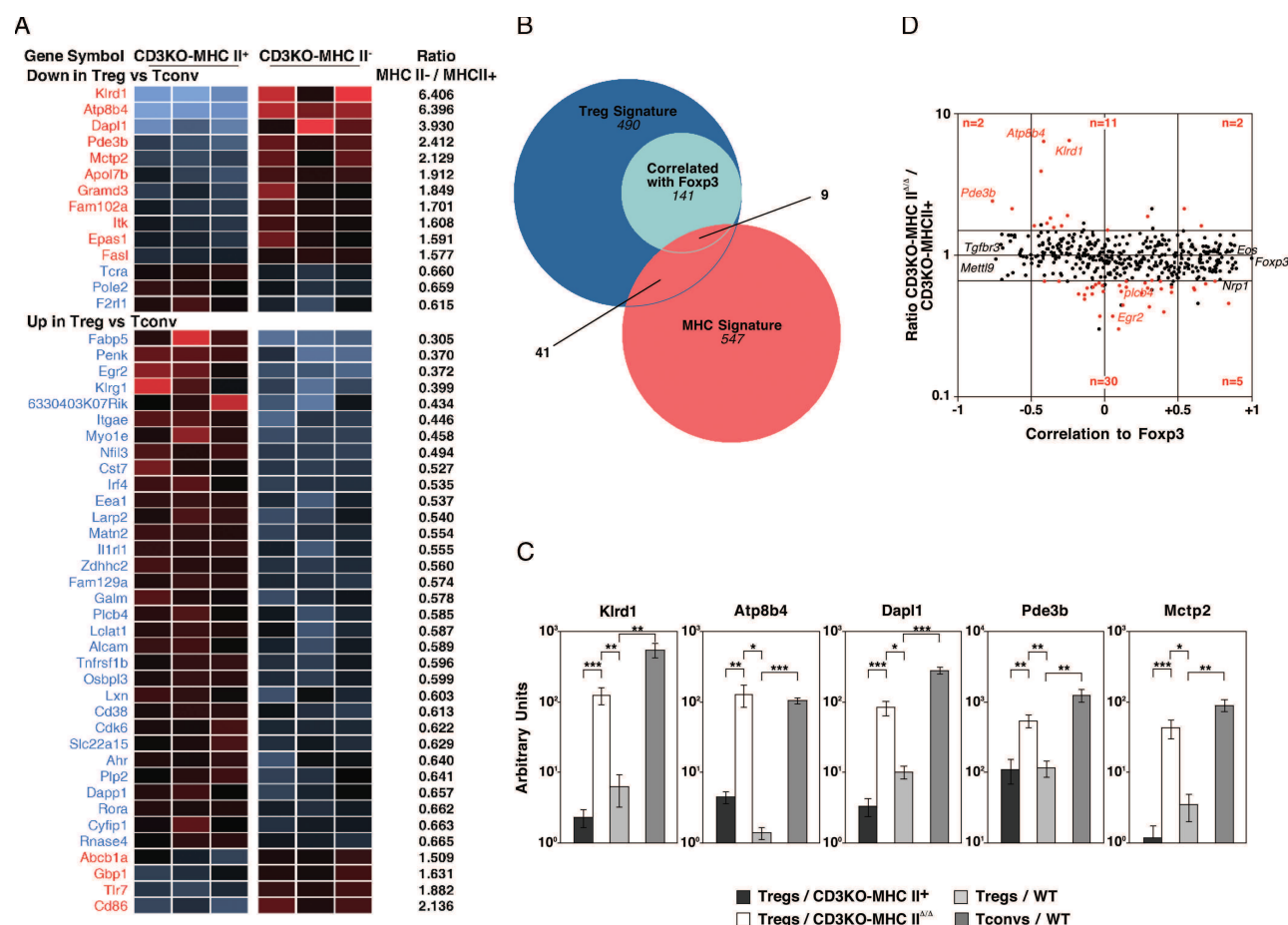


Figure 7. Gene expression profiling of self-deprived Treg cells. Treg cells were isolated by fluorescence-activated cell sorter (FACS) from the periphery of CD3KO-MHC II⁺ and CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice, 5 days after transfer. Total mRNA was isolated, amplified, biotin labeled, purified, and hybridized to Affymetrix mouse genome arrays. (A) Expression pattern of Affymetrix targets differentially expressed (± 1.5 -fold change) between Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} and CD3KO-MHC II⁺ recipient mice that have been identified as genes of the Treg-cell transcriptional signature by Hill et al. [28]. The Z-score normalized induction (red) or repression (blue) is shown for each Affymetrix target. (B) Overlapping between Foxp3-dependent genes of the Treg-cell signature and the self-deprived Treg-cell signature. (C) The transcript levels of a panel of the genes presented in (A) were analyzed by qRT-PCR in the indicated CD4⁺ T-cell subsets. Mean \pm SEM values of relative expression are shown for indicated genes and were calculated from six mice per group pooled from two independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student's unpaired t-test. (D) Scatter plot of the changes induced by self-deprivation versus the correlation values to Foxp3 for genes of the common Treg-cell signature. Red dots correspond to genes significantly differentially expressed between Treg cells from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} and CD3KO-MHC II⁺ recipient mice.

by Foxp3 (Pearson's correlation coefficient > 0.5 or < -0.5 as calculated in [28]). Interestingly, the transcription of only nine of these 141 genes was affected by self-deprivation (Fig. 7B). More precisely, we did not find any clear correlation between the Treg-cell genes affected by self-deprivation and Foxp3 (Fig. 7D). Similar results were obtained in the BM chimeras experimental model (Supporting Information Fig. 5D). Accordingly, the expression of several genes of the Treg-cell signature known to be strongly correlated with Foxp3 (such as Foxp3 itself) was unaffected by self-deprivation (Fig. 7D, Supporting Information Fig. 5D). Thus, continuous interactions with self induce unique transcriptional and functional signatures in Treg cells that do not rely on Foxp3 expression.

Discussion

In the periphery, Foxp3 expression is required to maintain Treg-cell suppressive capacities. Indeed, decreased Foxp3 expression in the periphery causes defective suppressive function of Treg cells and their conversion into effector cells, which contribute to, rather than inhibit, autoimmune diseases [26, 27, 29]. Recent data suggest strongly that IL-2 may play a role in the maintenance of peripheral Treg-cell suppressive capacities by promoting sustained expression of Foxp3 [18, 30, 31]. In the present article, we show that continuous interactions with self are required for maintaining Treg-cell suppressive function in the periphery. Indeed, peripheral Treg cells from mouse chimeras in which MHC

class II expression is restricted to the thymus lack suppressive activity. Similarly, Treg cells recovered 5 days after transfer into recipient mice lacking expression of MHC class II molecules are unable to inhibit the proliferative response of Tconv cells to anti-CD3 stimulation. By contrast to IL-2, TCR-dependent stabilization of peripheral Treg-cell suppressive function does not appear to rely on Foxp3 expression. Indeed, we found that Foxp3 expression is unaffected by self-deprivation. Moreover, among the genes of the Treg-cell signature in which expression is altered by self-deprivation, very few are known to be directly or indirectly controlled by Foxp3. In many aspects, self-deprived Treg cells share more functional and phenotypic similarities with Tconv cells than non-“self-deprived” Treg cells do. Indeed, several genes of the Treg-cell signature are similarly expressed by Tconv cells and self-deprived Treg cells. Moreover, self-deprived Treg cells mobilize intracellular calcium stores and upregulate CD69 as efficiently as Tconv cells do in response to anti-CD3 stimulation. Finally, the ability of self-deprived Treg cells to produce the anti-inflammatory cytokine, IL-10, is similar to that observed for Tconv cells. Thus, continuous interactions with self induce unique transcriptional and functional signatures in Treg cells that do not rely on Foxp3 expression.

Altogether, our data suggest strongly that Foxp3 expression, although necessary, is not sufficient to maintain the suppressive function of peripheral Treg cells. Such a conclusion may seem contradictory to previous data showing that ectopic Foxp3 expression is sufficient to induce suppressive capacities in Tconv cells [3–5]. In two of these studies, naive T cells were stimulated with anti-CD3 and IL-2 and transduced with a retrovirus expressing Foxp3 [3, 5]. Infected cells were thus receiving strong TCR signals while acquiring Foxp3 expression. In the last study, Khattri et al. used Foxp3 transgenic mice [4]. All T cells from these mice expressed Foxp3 and showed suppressor activity *in vitro*. Interestingly, although T cells from Foxp3 transgenic mice expressed higher amounts of Foxp3 than WT Treg cells, they were less efficient than the latter cells to control the proliferation of naive T cells in response to anti-CD3 stimulation. Thus, suppressor activity is not strictly correlated to Foxp3 expression level. One explanation could be that most T cells from Foxp3 transgenic mice are in fact naive T cells forced to express Foxp3, and that, as all naive T cells, they have only a limited affinity for self and subsequently receive only weak TCR signals.

Interruption of Tconv-cell contact with self-peptide MHC ligands leads to a rapid decline on signaling and response sensitivity to foreign stimuli [23]. In the present article, we show that in contrast with Tconv cells, self-deprivation does not lead to a defect in Treg-cell ability to be activated by TCR signals. On the contrary, their response was found to be augmented in terms of calcium mobilization, CD69 upregulation and proliferation. Recent data show that Treg cells deficient for the expression or expressing inactive forms of key molecules of the TCR signaling pathway exhibit defective suppressive function *in vitro* [32–36]. Nevertheless, in these studies, it was not possible to determine precisely at which step TCR signals were important. Indeed, it is now well established that engagement of their TCR during the *in vitro* assay is required for

allowing Treg cells to suppress the activation of responder T cells [21, 22]. Thus, the defective *in vitro* suppressive function of Treg cells with an impaired TCR signaling pathway may result either from inefficient integration of TCR signals resulting from continuous interactions with self *in vivo*, or from a defective response to anti-CD3 stimulation *in vitro*. Our experimental model allows us to discriminate between these two possibilities. Indeed, in the present article, we show that self-deprived Treg cells, although they respond well to anti-CD3 stimulation, lack suppressive function *in vitro*.

In the thymus, strong TCR signals lead to IL-2 sensitivity enhancement in developing thymocytes. Then, IL-2 signaling induces Foxp3 expression that, in turn, strengthens Treg-cell lineage stability [1, 2]. These three successive events are now well recognized to be important steps of thymic Treg-cell development. Then, Foxp3 expression is considered as sufficient to maintain natural Treg-cell suppressive function in the periphery. Recent data suggest that IL-2 is important to stabilize Foxp3 expression in peripheral Treg cells [18, 30, 31]. Our study places on firm ground the importance of continuous interactions with self in maintaining Treg-cell suppressive capacities in the periphery. Thus, the three actors leading to Treg-cell generation in the thymus still act in concert in the periphery to allow maintenance of their suppressive function.

Materials and methods

Mice

C57BL/6 mice were obtained from Harlan. C57BL/6 CD45.1 mice, C57BL/6 MHC II^{Δ/Δ} mice [37, 38], C57BL/6 CD3_ε^{-/-} mice (CD3KO [39]), and CD3_ε/MHC II^{Δ/Δ} double-deficient mice (CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} mice [40]) were maintained in our own animal facilities (Cochin Institute, Paris, France) under specific pathogen-free conditions in agreement with current European legislation on animal care, housing, and scientific experimentation. C57BL/6 Foxp3-GFP mice were obtained from Dr. B. Malissen [34]. All experiments were performed in compliance with French Ministry of Agriculture regulations for animal experimentation (number 75–562).

Adoptive transfer of BM cells

BM chimeras were generated as previously described [16].

Adoptive transfer of T cells

Peripheral cells were incubated on ice with anti-CD11b (Mac-1) and anti-CD19 (1D3) antibodies, and then with magnetic beads coupled to anti-rat immunoglobulin (DynaL Biotech). Purified

T-cell subsets were usually 90–95% pure. We injected 100×10^6 purified T cells i.v. into each recipient mouse.

IL-2 treatment

When indicated, mice were treated with daily i.p. injections of 200,000 IU of recombinant human IL-2 (Proleukin, Novartis).

In vitro suppression assay

Thymic and peripheral CD4⁺ T cells were purified as previously described [40] and labeled with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD25 antibodies (clone PC61, BD Biosciences). CD25⁺ T cells were then positively selected using magnetic-activated cell sorting (MACS) anti-PE microbeads (Miltenyi Biotech). After magnetic bead purification based on CD25, the percentage of Foxp3-expressing cells among CD4⁺ T cells was around 95% for WT mice, 90% for WT-CD3KO and MHC II^{Δ/Δ}-CD3KO chimeras, and at least 75% for CD3KO-MHC II⁺ and CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice. CD4⁺ CD25[−] cells purified from WT mice were labeled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes). A total of 5×10^4 CD4⁺ CD25[−] CFSE-labeled cells were then cultured alone or together with various numbers of CD4⁺ CD25⁺ cells purified from WT mice, BM chimeras, CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} or CD3KO-MHC II⁺ recipient mice, in the presence of soluble anti-CD3 antibodies (145–2C11; 0.2 μg/mL) and APCs (25×10^4 irradiated splenocytes from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} mice).

Preculture assays consisted in culture of various numbers of CD4⁺ CD25⁺ cells for 2 days in the presence of soluble anti-CD3 antibodies (0.2 μg/mL), 25×10^4 APC (irradiated splenocytes from CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} mice), and in the presence or absence of human recombinant IL-2. Culture medium was then washed away and 5×10^4 CD4⁺ CD25[−] CFSE-labeled cells were added per well with soluble anti-CD3 antibodies and 15×10^4 APCs. In all protocols, cells were recovered, stained, and analyzed by flow cytometry, 16–64 h after the beginning of culture.

In vivo suppression assay

Purified lymph node CD4⁺ T cells from C57BL/6 CD45.1 mice were stained for CD44 and CD25 expression and naive CD4⁺ Tconv cells, flow cytometry sorted as CD44^{−/low} CD25[−] cells. A total of 1.5×10^5 naive CD4⁺ Tconv cells (CD45.1) were injected alone or together with 1.5×10^5 Treg cells (CD45.2) from the indicated mice.

Flow cytometry

Cell surface and intracellular staining were performed as previously described [40].

In vitro Treg-cell activation

For calcium measurements, T cells were loaded with 0.5 μM Fura-2/AM (Molecular Probes) for 15 min at 37°C. T cells were stimulated with anti-CD3 antibody (145–2C11; 10 μg/mL). Images were acquired at 37°C every 5 s on a Nikon microscope, with a 20× objective. Cells were excited alternatively at 350 and 380 nm and emissions at 510 nm were used to measure Ca variations with Metafluor software (Molecular devices). Ca levels are represented as a 350/380 fluorescence intensity ratio normalized to the ratio at t0. For studying CD69 expression and proliferation in response to stimulation, Treg cells were cultured alone in the presence of soluble anti-CD3 antibodies (0.2 μg/mL) and 25×10^4 APCs.

Microarray

Treg cells from CD3KO-MHC II⁺ and CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipients as well as from WT-CD3KO and MHC II^{Δ/Δ}-CD3KO chimeras were enriched as described above and flow cytometry sorted as CD4⁺ TCRβ⁺ CD25⁺ cells. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (QIAGEN). A total of 100 ng of total RNA was reversed transcribed following the Genechip Whole transcript (WT) Sense Target labeling assay kit (Affymetrix). The cDNA obtained was then purified, fragmented, and hybridized to GeneChip[®] murine Gene (Affymetrix) at 45°C for 17 h. Statistical analysis was then performed with MEV software (TIGR, Rockville MD, USA). Data discussed in this publication have been deposited in the Gene Expression Omnibus at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (accession number GSE27153).

qRT-PCR analysis

Total RNA was isolated from flow cytometry sorted cells as described above and reverse transcribed with SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen) using 100 ng of Random Hexamers. Quantitative PCR analysis was performed using Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and a real-time PCR system (ABI7300; Applied Biosystems) according to standard PCR conditions. For quantitative calculations, results were normalized to hprt expression. Primers used are listed in Supporting Information Table 1.

Calculations

The average number of cell divisions in response to anti-CD3 stimulation was calculated as follows. First, we estimated the CFSE dilution factor (f) due to stimulation: $f = \text{CFSE mean fluorescence intensity (MFI) in absence of stimulation} / \text{CFSE MFI in presence of stimulation}$. Then, as the intracellular amount of CFSE is halved during each cell cycle, the average number of cell

divisions (A) was calculated with the following formula: $A = \text{LOG}_2(f)$. Inhibition indexes were calculated as follows:

Proliferation Inhibition = $100 \times (([A(\text{CD4}^+ \text{ Treg cells} = 0) - A(\text{CD4}^+ \text{ Treg cells} = +)] / A(\text{CD4}^+ \text{ Treg cells} = 0))$ in which A is the average number of cell divisions in response to anti-CD3 stimulation calculated as explained above.

CD25 Expression Inhibition = $100 \times ((\% \text{CD25}^+ \text{ among CD4}^+ \text{ Tconv cells (CD4}^+ \text{ Treg cells} = 0) - \% \text{CD25}^+ \text{ among CD4}^+ \text{ Tconv cells (CD4}^+ \text{ Treg cells} = +)) / \% \text{CD25}^+ \text{ among CD4}^+ \text{ Tconv cells (CD4}^+ \text{ Treg cells} = 0))$.

Statistics

Data are expressed as mean \pm SEM, and the significance of differences between two series of results was assessed using the Student's unpaired *t*-test. Values of $p < 0.05$ were considered significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Acknowledgments: We thank A. Trautmann, A. Le Bon, B. Martin, D. Fradin, and F. Lepault for comments on the manuscript, L. Stouvenel and M. Desousa for their invaluable help in cell sorting. Authors are indebt to B. Malissen for providing Foxp3-GFP mice. This work was supported by a grant from the "Ligue contre le Cancer" and by a grant from the "Association pour la Recherche contre le Cancer." A. Pommier was supported by a Ph.D. fellowship from the "Association pour la Recherche sur le Cancer."

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Burchill, M. A., Yang, J., Vang, K. B., Moon, J. J., Chu, H. H., Lio, C. W., Vegoe, A. L. et al., Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 2008. **28**: 112–121.
- Lio, C. W. and Hsieh, C. S., A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 2008. **28**: 100–111.
- Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003. **299**: 1057–1061.
- Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S. A. and Ramsdell, F., An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 2003. **4**: 337–342.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y., Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003. **4**: 330–336.
- Bautista, J. L., Lio, C. W., Lathrop, S. K., Forbush, K., Liang, Y., Luo, J., Rudensky, A. Y. et al., Intracloal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Immunol.* 2009. **10**: 610–617.
- Leung, M. W., Shen, S. and Lafaille, J. J., TCR-dependent differentiation of thymic Foxp3+ cells is limited to small clonal sizes. *J. Exp. Med.* 2009. **206**: 2121–2130.
- Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Naji, A. et al., Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2001. **2**: 301–306.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L. and von Boehmer, H., Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.* 2002. **3**: 756–763.
- Hsieh, C. S., Liang, Y., Tyznik, A. J., Self, S. G., Liggitt, D. and Rudensky, A. Y., Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 2004. **21**: 267–277.
- Hsieh, C. S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J. D. and Rudensky, A. Y., An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* 2006. **7**: 401–410.
- Samy, E. T., Parker, L. A., Sharp, C. P. and Tung, K. S., Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4+CD25+ regulatory T cells in the regional lymph node. *J. Exp. Med.* 2005. **202**: 771–781.
- Setiady, Y. Y., Ohno, K., Samy, E. T., Bagavant, H., Qiao, H., Sharp, C., She, J. X. et al., Physiologic self antigens rapidly capacitate autoimmune disease-specific polyclonal CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood* 2006. **107**: 1056–1062.
- Lathrop, S. K., Santacruz, N. A., Pham, D., Luo, J. and Hsieh, C. S., Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population. *J. Exp. Med.* 2008. **205**: 3105–3117.
- Darrasse-Jeze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Vitoria, G. D., Eisenreich, T., Yao, K. H., Masilamani, R. F. et al., Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 2009. **206**: 1853–1862.
- Poirasson-Riviere, M., Bienvenu, B., Le Campion, A., Becourt, C., Martin, B. and Lucas, B., Regulatory CD4+ T cells are crucial for preventing CD8+ T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol.* 2008. **180**: 7294–7304.
- Martin, B., Becourt, C., Bienvenu, B. and Lucas, B., Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4+ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood* 2006. **108**: 270–277.
- Grinberg-Bleyer, Y., Baeyens, A., You, S., Elhage, R., Fourcade, G., Gregoire, S., Cagnard, N. et al., IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2010. **207**: 1871–1878.
- Bochtler, P., Wahl, C., Schirmbeck, R. and Reimann, J., Functional adaptive CD4 Foxp3 T cells develop in MHC class II-deficient mice. *J. Immunol.* 2006. **177**: 8307–8314.
- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Buren-Defranoux, O., Barbosa, T. C., Cumano, A. and Bandeira, A., CD25+CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.* 2001. **166**: 3008–3018.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J. et al., Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 1998. **10**: 1969–1980.
- Thornton, A. M. and Shevach, E. M., CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 1998. **188**: 287–296.
- Garbi, N., Hammerling, G. J., Probst, H. C. and van den Broek, M., Tonic T cell signalling and T cell tolerance as opposite effects of self-recognition on dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2010. **22**: 601–608.

- 24 Gavin, M. A., Clarke, S. R., Negrou, E., Gallegos, A. and Rudensky, A., Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 2002. **3**: 33–41.
- 25 Tang, Q. and Bluestone, J. A., The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* 2008. **9**: 239–244.
- 26 Wan, Y. Y. and Flavell, R. A., Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007. **445**: 766–770.
- 27 Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S. L., Jeker, L. T., Penaranda, C., Martinez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M. et al., Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 2009. **10**: 1000–1007.
- 28 Hill, J. A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D. et al., Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 2007. **27**: 786–800.
- 29 Komatsu, N., Mariotti-Ferrandiz, M. E., Wang, Y., Malissen, B., Waldmann, H. and Hori, S., Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2009. **106**: 1903–1908.
- 30 Yu, A., Zhu, L., Altman, N. H. and Malek, T. R., A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity* 2009. **30**: 204–217.
- 31 Duarte, J. H., Zelenay, S., Bergman, M. L., Martins, A. C. and Dementgeot, J., Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur. J. Immunol.* 2009. **39**: 948–955.
- 32 Kim, J. K., Klinger, M., Benjamin, J., Xiao, Y., Erle, D. J., Littman, D. R. and Killeen, N., Impact of the TCR signal on regulatory T cell homeostasis, function, and trafficking. *PLoS One* 2009. **4**: e6580.
- 33 Tanaka, S., Maeda, S., Hashimoto, M., Fujimori, C., Ito, Y., Teradaira, S., Hirota, K. et al., Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J. Immunol.* 2010. **185**: 2295–2305.
- 34 Wang, Y., Kissenpennig, A., Mingueneau, M., Richelme, S., Perrin, P., Chevrier, S., Genton, C. et al., Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2008. **180**: 1565–1575.
- 35 Patton, D. T., Garden, O. A., Pearce, W. P., Clough, L. E., Monk, C. R., Leung, E., Rowan, W. C. et al., Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 delta is critical for the function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2006. **177**: 6598–6602.
- 36 Fu, G., Chen, Y., Yu, M., Podd, A., Schuman, J., He, Y., Di, L. et al., Phospholipase C[gamma]1 is essential for T cell development, activation, and tolerance. *J. Exp. Med.* 2010. **207**: 309–318.
- 37 Madsen, L., Labrecque, N., Engberg, J., Dierich, A., Svejgaard, A., Benoist, C., Mathis, D. et al., Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999. **96**: 10338–10343.
- 38 Martin, B., Bourgeois, C., Dautigny, N. and Lucas, B., On the role of MHC class II molecules in the survival and lymphopenia-induced proliferation of peripheral CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003. **100**: 6021–6026.
- 39 Malissen, M., Gillet, A., Ardouin, L., Bouvier, G., Trucy, J., Ferrier, P., Vivier, E. et al., Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-e gene. *EMBO J.* 1995. **14**: 4641–4650.
- 40 Le Campion, A., Gagnerault, M. C., Auffray, C., Becourt, C., Poitrasson-Riviere, M., Lallemand, E., Bienvenu, B. et al., Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. *Blood* 2009. **114**: 1784–1793.

Abbreviations: LIP: lymphopenia-induced proliferation · qRT-PCR: quantitative reverse transcriptase PCR · self-deprivation: lack of MHC class II expression

Full correspondence: Dr. Bruno Lucas, Cochin Hospital, 75014 Paris, France
 Fax: +33-1-40516535
 e-mail: bruno.lucas@inserm.fr

Additional correspondence: Dr. Cédric Auffray, Cochin Hospital, 75014 Paris, France
 Fax: +33-1-40516535
 e-mail: cedric.auffray@inserm.fr

Received: 4/10/2011
 Revised: 16/12/2011
 Accepted: 19/1/2012

SUPPORTING INFORMATION

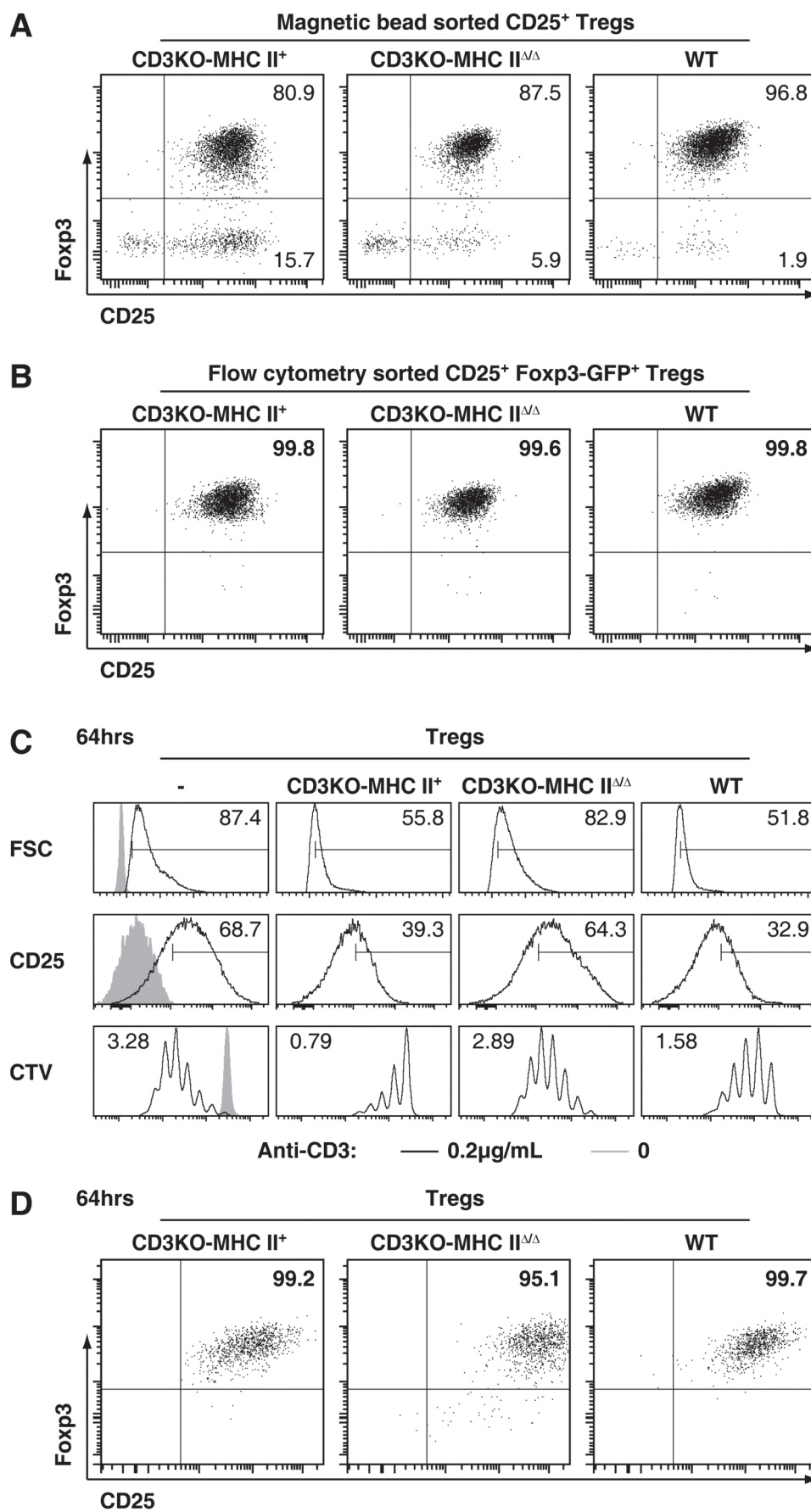


Figure S1. Highly purified self-deprived Treg cells are not functional in vitro.

T cells purified from the periphery (lymph nodes + spleen) of C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected into CD3KO mice (CD3KO-MHC II⁺ recipients) or into CD3KO-MHC II^{ΔΔ} mice (CD3KO-MHC II^{ΔΔ} recipients). (A) 5 days later, Treg cells were purified from the periphery of recipient mice as CD25⁺ CD4⁺ T cells using magnetic beads. Treg cells were also purified from lymph-nodes of C57BL/6 Foxp3-GFP mice. Representative CD25 / Foxp3-GFP fluorescence dot-plots for gated CD4⁺ T cells are shown. (B) Treg cells were further purified by flow cytometry as CD25⁺ Foxp3-GFP⁺ cells. Representative CD25 / Foxp3-GFP fluorescence dot-plots are shown. (C) The suppressive capacities of these highly purified Treg cells were then analyzed. Tconv cells (GFP⁻ CD4⁺ T cells) were purified from lymph nodes of C57BL/6 Foxp3-GFP mice, labeled with Cell Trace Violet (CTV) and cultured alone (-) or together with the indicated Treg cells at a 1/1 Treg/Tconv-cell ratio. FSC, CD25 and CFSE histograms of Tconv cells (CTV⁺) are shown 64 hours after the beginning of culture. For CFSE histograms, numbers correspond to the average number of cell divisions undergone by Tconv cells in response to anti-CD3 stimulation during the culture period. (D) Representative CD25 / Foxp3-GFP fluorescence dot-plots for gated Treg cells (CTV⁻) are shown 64 hours after the beginning of culture. Data are representative of two individual experiments.

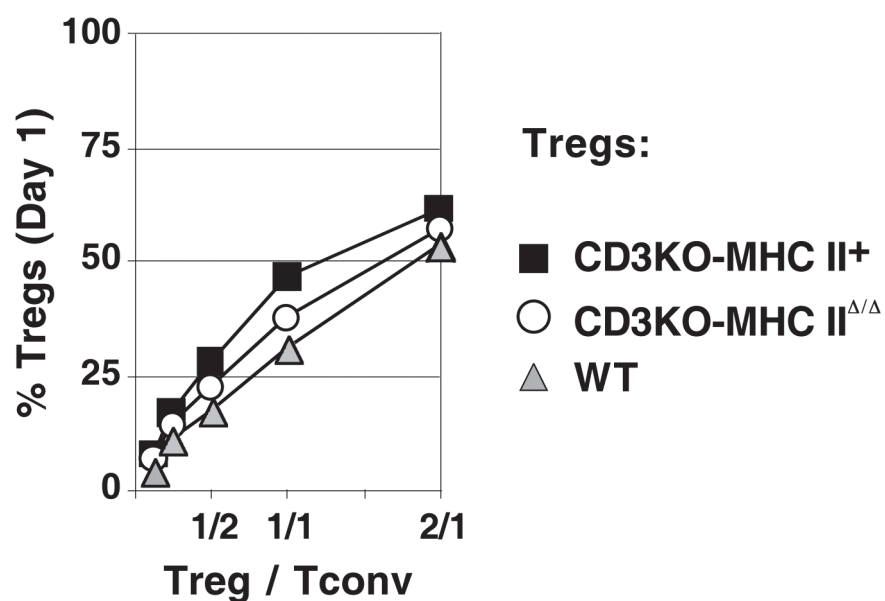


Figure S2. Unaltered survival of self-deprived Treg cells in culture.

Treg cells were purified from the periphery of CD3KO-MHC II⁺ and CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipient mice 5 days after transfer. Treg cells and Tconv cells were also purified from lymph-nodes of WT mice. Tconv cells were labeled with CFSE and cultured together with the indicated Treg cells at various Treg/Tconv-cell ratios, in the presence of soluble anti-CD3 and APC. 16 hours after the beginning of culture, cells were stained for CD4 and CD8 α expression and the proportion of Treg cells (CD4⁺ CD8 α ⁻ CFSE⁻) cells determined.

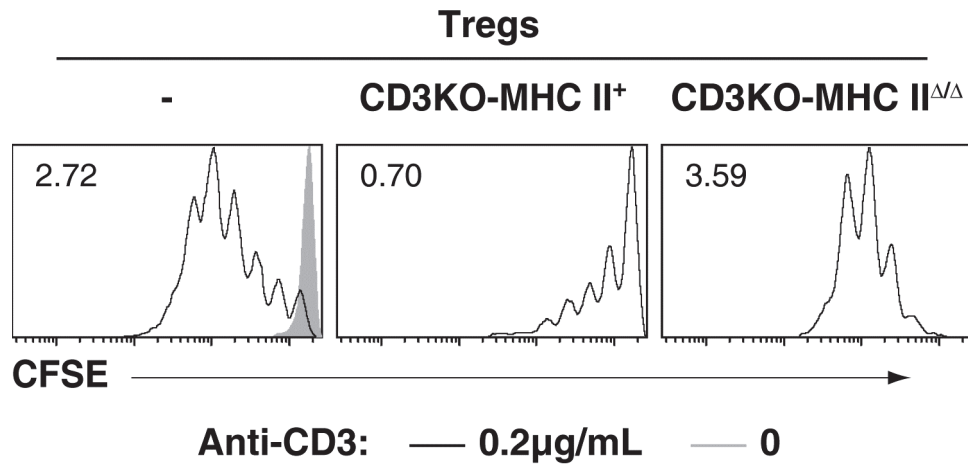


Figure S3. IL-2 is not sufficient to restore the suppressive function of self-deprived Treg cells.

T cells purified from the periphery (lymph nodes + spleen) of WT mice were injected into CD3KO mice (CD3KO-MHC II⁺ recipients) or into CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} mice (CD3KO-MHC II^{Δ/Δ} recipients). 5 days later, Treg cells were purified from the periphery of recipient mice as CD25⁺ CD4⁺ T cells using magnetic beads. Treg cells from the indicated mice were cultured for 2 days with IL-2 and APCs. Then, they were tested for their suppressive abilities. Briefly, CD4⁺ CD25⁻ cells (Tconv cells) were purified from lymph nodes of WT mice, labeled with CFSE and cultured alone (-) or together with the indicated Treg cells at a 1/1 Treg/Tconv-cell ratio. CFSE fluorescence histograms of Tconv cells (CFSE⁺) are shown 64 hours after the beginning of culture. Histograms in the absence of anti-CD3 stimulation are shown (filled histograms). Numbers correspond to the average number of cell divisions undergone by Tconv cells in response to anti-CD3 stimulation during the culture period. Data are representative of two individual experiments.

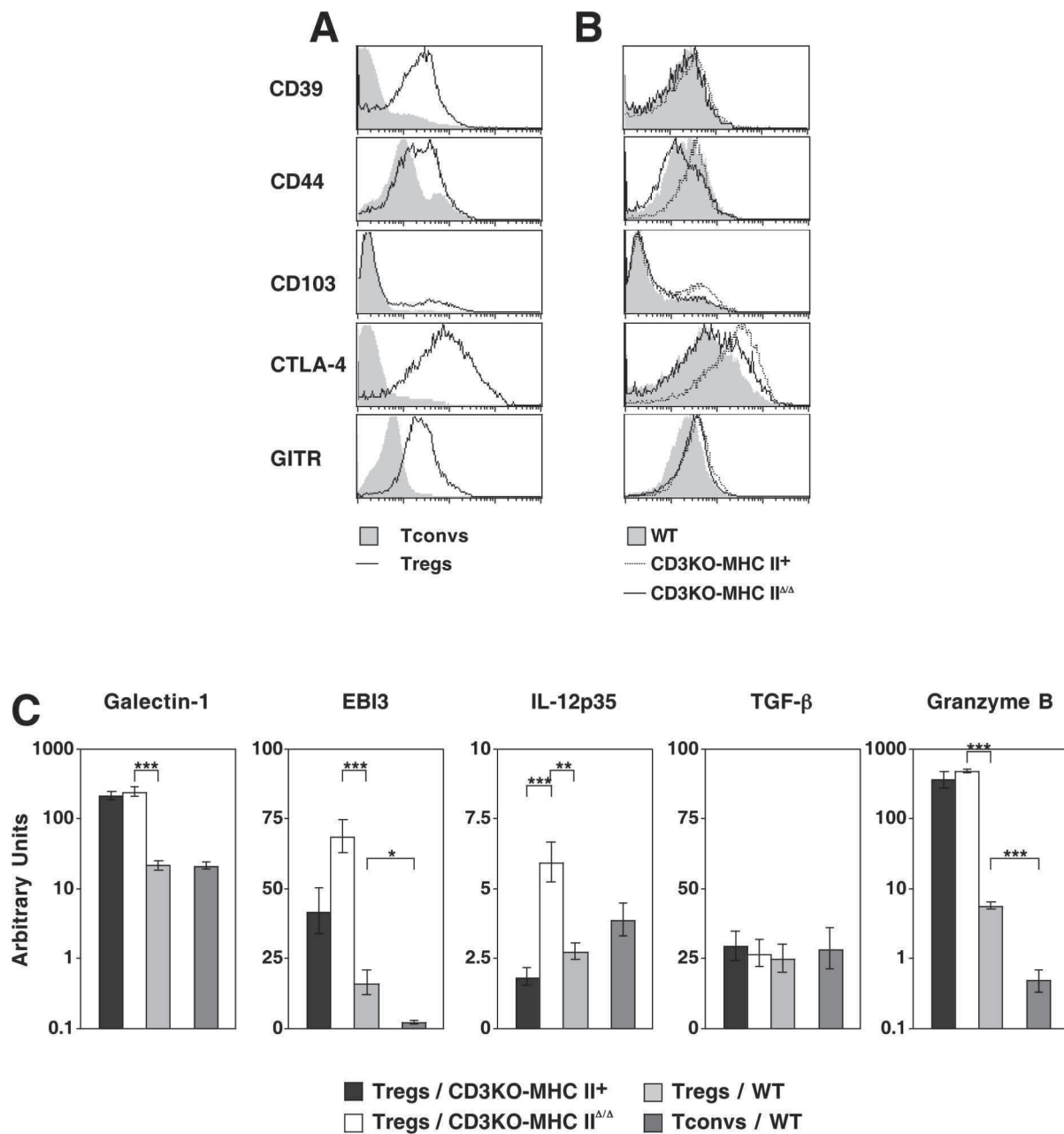


Figure S4. Phenotypic analysis of self-deprived Treg cells.

The periphery of CD3KO-MHC II⁺ and CD3KO-MHC II^{ΔΔ} recipient mice was harvested 5 days after transfer. Periphery of WT mice was also recovered. (A) CD39, CD44, CD103, CTLA-4 and GITR fluorescence histograms of peripheral CD4⁺ CD8_a⁻ Foxp3⁺ (Treg cells; plain line) and CD4⁺ CD8_a⁻ Foxp3⁻ (Tconv cells; filled) cells are shown for WT mice. (B) The expression of these same markers is shown for peripheral Treg cells of CD3KO-MHC II⁺ recipient mice, (dotted line), CD3KO-MHC II^{ΔΔ} (bold line) and WT mice (filled) 5 days after transfer. The histograms shown were generated from the data for one mouse, but are representative of three individual experiments with three mice per group. (C) The transcript levels of Galectin-1, EBI3, IL-12p35, TGF-β and Granzyme B were analyzed by qRT-PCR in the indicated CD4⁺ T cell subsets. Mean values ± SEM of relative expression are shown for indicated genes. (* p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001).

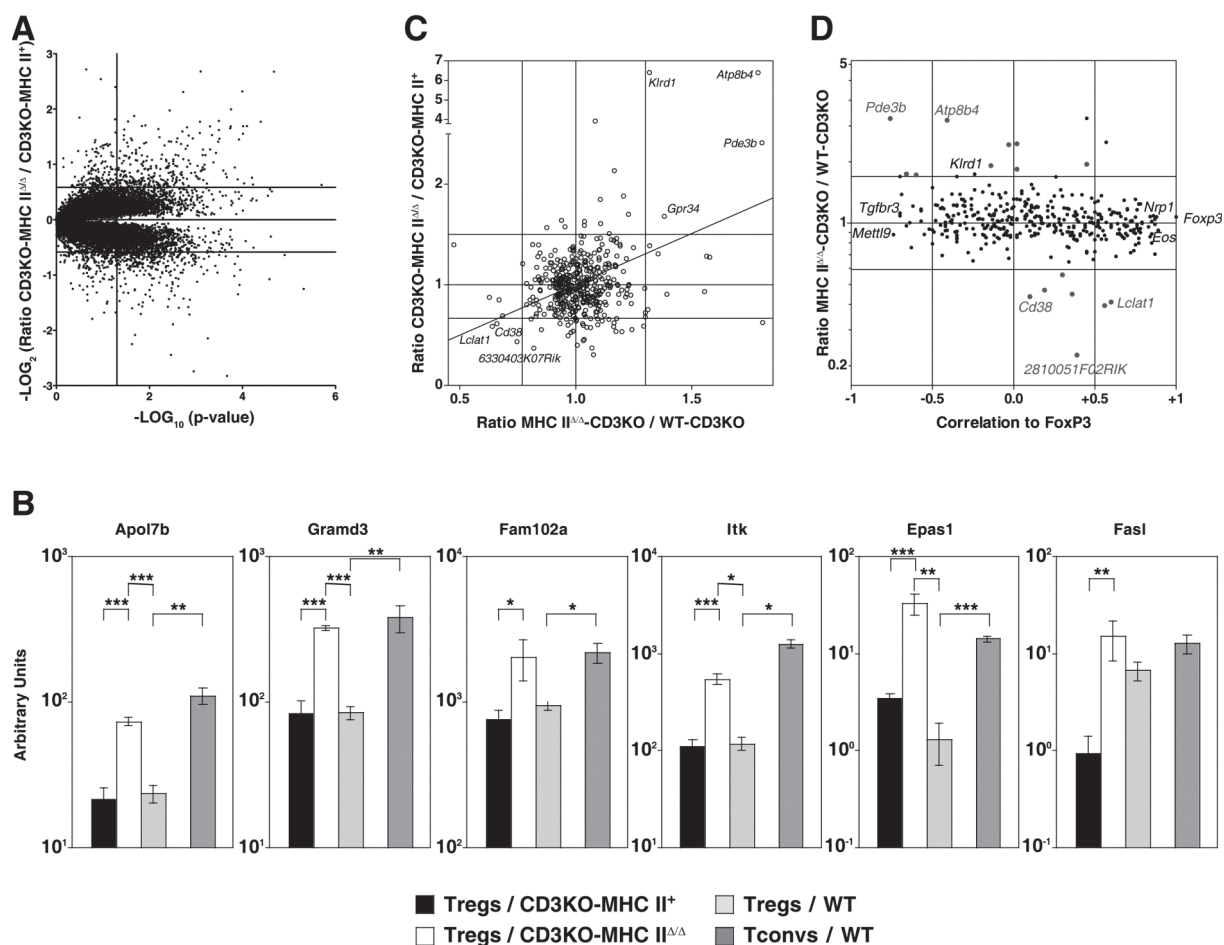


Figure S5. Self-deprived Treg cells from MHC II^{ΔΔ}-CD3KO chimeras exhibit altered transcriptional signature.

(A) “Volcano plot” representation (Log₂(fold change) versus Log₁₀(t test p value)) between Tregs from CD3KO-MHC II^{ΔΔ} and CD3KO-MHC II⁺ recipient mice. (B) The transcript levels of a panel of the genes presented in Figure 7A were analyzed by qRT-PCR in the indicated CD4⁺ T cell subsets. Mean ± SEM values of relative expression are shown for indicated genes. (* p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001). (C) Microarray analysis of Treg cells from chimeras and adoptive transfers revealed overlapping results. Analysis was restricted to genes of the common Treg-cell signature. (D) Any clear correlation can be observed between the Treg-cell genes affected by self-deprivation in the chimera experimental model and Foxp3. Scatter plot of the changes induced by self-deprivation versus the correlation values to Foxp3 for genes of the common Treg-cell signature. Red dots corresponds to genes significantly differentially expressed between Treg cells from MHC II^{ΔΔ}-CD3KO and WT-CD3KO chimeras.

Genes	sequence 5'→3'
<i>Apol7b forward</i>	5'-CCTTGAGTGAAGCCCTGGGTAAGA-3'
<i>Apol7b reverse</i>	5'-CAGTTTCACCCGAGGATAAGCAT-3'
<i>Atp8b4 forward</i>	5'-TGCCATCAATATCGGTTATGCC-3'
<i>Atp8b4 reverse</i>	5'-TTCCTGAGTTCTTCTCGCACTTCC-3'
<i>Dapl1 forward</i>	5'-GTGCCATCACAAATGTCGCCAAGA-3'
<i>Dapl1 reverse</i>	5'-GTGCCGTGTGAACTGTCGCTGGA3'
<i>Ebi3 forward</i>	5'-TTGTGGCTGAGCGAATC-3'
<i>Ebi3 reverse</i>	5'-GCGGAGTCGGTACTTGA-3'
<i>Epas1 forward</i>	5'-TTGGGAAGAAGAGCAAAGACGTGT-3'
<i>Epas1 reverse</i>	5'-GCCGACTTGAGGTTGACAGT-3'
<i>Fam102a forward</i>	5'-GAAGATGGACAGAGCCCTAGTGTG-3'
<i>Fam102a reverse</i>	5'-GGGCAGTCTTCCTGACAGTACCAA-3'
<i>Fasl forward</i>	5'-AGGAGTGTGGCCCATTTAACAG-3'
<i>Fasl reverse</i>	5'-TCACTCCAGAGATCAGAGCGGTTC-3'
<i>Gramd3 forward</i>	5'-TCTGTGTGCGGACACTTAGAGA-3'
<i>Gramd3 reverse</i>	5'-TGAAATCCAGAGGCAGAGACGAAG-3'
<i>Gzmb forward</i>	5'-CTCCACGTGCTTTCACCAA-3'
<i>Gzmb reverse</i>	5'-AGGATCCATGTTGCTTCTGTAGTTAG-3'
<i>Hprt forward</i>	5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3'
<i>Hprt reverse</i>	5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3'
<i>Il10 forward</i>	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'
<i>Il10 reverse</i>	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
<i>Il-12p35 forward</i>	5'-CCTTGCCCTCCTAAACCAC-3'
<i>Il-12p35 reverse</i>	5'-TTTCGGGACTGGCTAAGACA-3'
<i>Itk forward</i>	5'-CCCTGGTCATTGCCTTGTACGAC-3'
<i>Itk reverse</i>	5'-TCTCGGAGCTGTCCAGCAGGTAGT-3'
<i>Klrd1 forward</i>	5'-CAGTCCAAGCAAAAGCGTTTCT-3'
<i>Klrd1 reverse</i>	5'-CCGTGGACCTTCCTTGTCTATACC-3'
<i>Lgals1 forward</i>	5'-GTCGCCAGCAACCTGAATCTC-3'
<i>Lgals1 reverse</i>	5'-GGGCATTGAAGCGAGGATTG-3'
<i>Mctp2 forward</i>	5'-CGACAAGACTCACGGCAATGACGA-3'
<i>Mctp2 reverse</i>	5'-TGGTGAGGAGGTACGCGAAGG-3'
<i>Pde3b forward</i>	5'-CCGGGACATTCCATATCAC-3'
<i>Pde3b reverse</i>	5'-ATCTGCTTTGGTTTCCGTTTCA-3'
<i>Tgfb1 forward</i>	5'-CGCAACAACGCCATCTATGA-3'
<i>Tgfb1 reverse</i>	5'-GCACTGCTTCCCGAATGTCT-3'

Table S1: primers

Article 2 :

Peripheral selection with age of highly suppressive regulatory CD4 T cells.

Arnaud Delpoux^{1,2,3}, Philippe Yakonowsky^{1,2,3}, Céline Charvet^{1,2,3}, Michael Valente^{1,2,3}, Arnaud Pommier^{1,2,3}, Aurélie Durand^{1,2,3}, Bruno Martin^{1,2,3}, Cédric Auffray^{1,2,3*} et Bruno Lucas^{1,2,3*}.

1 CNRS UMR8104, Hôpital Cochin, Paris, France

2 INSERM U567, Hôpital Cochin, Paris, France

3 Université Paris René Descartes, Hôpital Cochin, Paris, France

* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail.

Dans cette étude, nous montrons que, chez les jeunes souris, les cellules T régulatrice (Tregs) périphériques peuvent être subdivisées en deux sous-populations selon l'expression de Ly-6C. L'analyse phénotypique, l'imagerie et les expériences de transfert adoptif de Tregs périphériques Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ ont révélé que la non-expression de Ly-6C par environ 70% des Tregs périphériques était dépendante de la signalisation du TCR. En accord avec leur plus grande capacité à recevoir les signaux du TCR, les Treg Ly-6C⁻ expriment des quantités plus élevées, à leur surface, de molécules immunosuppressives clés telles que CD25, CTLA-4, CD39 et CD73 que les cellules Treg Ly-6C⁺ et sont les seules à produire constitutivement des cytokines anti-inflammatoires. En accord avec leur phénotype, seules les Tregs Ly-6C⁻ possèdent des capacités suppressives à la fois *in vitro* et *in vivo*. Enfin, alors que les Treg Ly-6C⁻ maintiennent leurs nombres avec l'âge, les Treg Ly-6C⁺ disparaissent progressivement. Dans l'ensemble, nos données montrent que le maintien des fonctions suppressives et de la survie des Tregs CD4⁺ sont reliés sur leur capacité à recevoir des signaux continus du TCR.

Peripheral selection with age of highly suppressive regulatory CD4 T cells

By

Arnaud Delpoux^{1,2,3}, Philippe Yakonowsky^{1,2,3}, Céline Charvet^{1,2,3}, Michael Valente^{1,2,3},
Arnaud Pommier^{1,2,3}, Aurélie Durand^{1,2,3}, Bruno Martin^{1,2,3}, Cédric Auffray^{1,2,3*} and Bruno
Lucas^{1,2,3*}

¹CNRS UMR8104 and ²INSERM U1016 and ³Paris Descartes University, Cochin Hospital,
75014 Paris, France

Corresponding author: Dr. Bruno Lucas (bruno.lucas@inserm.fr), Cochin Hospital, 75014
Paris, France. Phone: 33-1-40516590; Fax: 33-1-40516535

* Cédric Auffray and Bruno Lucas contributed equally to this paper

ABSTRACT

In young mice, peripheral Treg cells can be subdivided into two subsets according to Ly-6C expression. Phenotypic analysis, imaging and adoptive transfer experiments of peripheral Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ Treg cells reveal that the non-expression of Ly-6C by about 70% of peripheral Treg cells depends on TCR signaling events. Interestingly, Ly-6C⁻ Treg cells express higher surface amounts of key immunosuppressive molecules than Ly-6C⁺ Treg cells and to produce constitutively anti-inflammatory cytokines. In line with their phenotype, only Ly-6C⁻ Treg cells display suppressive capacities both *in vitro* and *in vivo*. Finally, whereas Ly-6C⁻ Treg cells maintain their numbers with age, Ly-6C⁺ Treg cells gradually disappear. Altogether, our data strongly suggest that both the survival and suppressive functions of peripheral CD4 Treg cells rely on their ability to receive strong TCR signals. The regulatory CD4 T-cell compartment is thus shaped with age toward the most suppressive cells in the periphery.

INTRODUCTION

Foxp3-expressing regulatory CD4 T cells (CD4 Treg cells) are critically involved in the maintenance of self-tolerance and regulation of immune responses (Sakaguchi, 2000; Shevach, 2000). In particular, they are key players in the prevention of various autoimmune and inflammatory disorders. CD4 Treg cells can be divided into two classes depending on their ontogeny: natural Treg cells (nTreg cells) that arise in the thymus and induced Treg cells (iTreg cells) that are generated in the periphery. Studies in mice suggest that the TCR has an instructive role in inducing commitment of developing thymocytes into the regulatory T-cell lineage (Bautista et al., 2009; Leung et al., 2009). This model is supported by the observation of a limited amount of overlap (10-20%) between the TCR sequences expressed within the conventional CD4 T cell- and the CD4 Treg cell-repertoire (Hsieh et al., 2004; Wong et al., 2007). Interestingly, overlapping is more important when the Treg cell-repertoire is compared with the repertoire of pathogenic autoreactive effector T cells (Hsieh et al., 2006; Liu et al., 2009). Altogether, these results suggest that nTreg cells develop in the thymus as the result of strong TCR signals, thereby yielding a compartment that is enriched for reactivity against self-antigens.

As a second pathway for Treg-cell generation, conversion of conventional CD4 T cells into iTreg cells within the periphery is possible under a variety of conditions (Bilate and Lafaille, 2012). Commitment to the iTreg-cell lineage is considered to depend mostly on the immunological context in which conventional CD4 T cells are immersed at the time of their activation. In particular, exposure to TGF β (in the absence of IL-6) appears to be critical for iTreg-cell generation. Nevertheless, differentiation of conventional CD4 T cells into iTreg cells upon stimulation also relies on intrinsic factors such as the avidity of the TCR they express for both self (Martin et al., 2013) and foreign ligands (Gottschalk et al., 2010). Indeed, Gottschalk et al. have shown that a low dose of a strong agonist resulted in maximal induction of iTreg cells (Gottschalk et al., 2010). Moreover, we have recently shown that the ability of a naïve CD4 T cell to commit into the iTreg-cell lineage pathway upon appropriate stimulation is shaped by its capacity to interact with self antigens in its original environment (Martin et al., 2013).

Thus, the Treg-cell repertoire of both natural and induced Treg cells is enriched in cells expressing high affinity TCRs for self antigens. We have recently shown that Ly-6C expression allows the discrimination of lowly and highly self-reactive naïve CD4 T cells

[CD4 T_N cells, (Martin et al., 2013)]. Interestingly, peripheral CD4 Treg cells can also be subdivided into two subsets according to Ly-6C expression. In the present paper, we have studied the ontogeny, homeostasis and functional abilities of these 2 newly defined CD4 Treg-cell subsets.

RESULTS

CD4 Treg cells can be subdivided into two subsets on the basis of Ly-6C expression

Throughout this study, CD4 Treg cells were defined as Foxp3⁺ CD4⁺ CD8α⁻ TCRβ⁺ cells. (Supplementary Fig. S1). CD4 Treg cells from the secondary lymphoid organs of C57BL/6 mice [peripheral and mesenteric lymph nodes (pLNs and mLNs respectively) and spleen] can be subdivided into 2 subsets according to Ly-6C expression (Fig. 1A). In all of them, about 30% of CD4 Treg cells expressed Ly-6C. In contrast, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells were almost completely absent in the thymus. Therefore, like for CD4 T_N cells (Martin et al., 2013), Ly-6C expression divides the CD4 Treg cell compartment into two subsets in secondary lymphoid organs.

We then injected Ly-6C⁻ CD4 Treg thymocytes into mice expressing or lacking MHC class II molecules (Fig. 1B). Ly-6C⁻ CD4 Treg thymocytes gave rise to both Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells after transfer into MHC class II-competent recipient mice (Fig. 1C). Thus, nTreg cells are comprised within both Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ cells. Interestingly, all CD45.2⁺ CD4 Treg cells recovered from MHC class II-deficient recipient mice were rapidly expressing Ly-6C suggesting that, like for CD4 T_N cells (Martin et al., 2013), down-modulation of Ly-6C expression by CD4 Treg cells depends on continuous interactions with MHC class II molecules.

It has been recently shown that neuropilin-1 (Nrp-1) expression distinguishes nTreg cells and iTreg cells in the periphery with iTreg cells not expressing this marker (Weiss et al., 2012; Yadav et al., 2012). As already shown by others (Weiss et al., 2012), an important proportion of Nrp-1⁻ cells among CD4 Treg cells can be observed in the Peyer's patches and the small intestine (Fig. 1D). Both Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ CD4 Treg cells comprised Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ cells suggesting that Ly-6C does not allow discrimination between iTreg and nTreg cells (Fig. 1E). Of note, among Nrp-1⁻ CD4 Treg cells, the proportion of Ly-6C-expressing cells gradually decreased from secondary lymphoid organs to the environmental surface represented by the small intestine.

Lack of Ly-6C expression in peripheral CD4 Treg cells relies on TCR signaling events

We hypothesized that, like for naïve CD4 T cells, Ly-6C surface levels on peripheral CD4 Treg cells might predict their propensity to interact with self-MHC class II molecules.

Consistent with our hypothesis, we observed that Ly-6C⁻ CD4 Treg cells exhibited significantly higher densities of CD5 compared to their Ly-6C⁺-cell counterparts (Fig. 2A). In line with a higher capacity of Ly-6C⁻ CD4 Treg cells to interact with self, we found that the extent of CD3ζ phosphorylation was far more important in these cells when compared to both Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and CD4 T_N cells (pζ/ζ ratio, Fig. 2B).

TCR signals induce phosphorylation cascades leading, in particular, to the relocalization of peculiar transcription factors. Whereas some of them move from the cytoplasm to the nucleus, others are in contrast excluded from the nucleus upon activation. Following stimulation, NFAT dephosphorylation leads to its translocation into the nucleus (Müller and Rao, 2010). Conversely, upon phosphorylation, transcription factors of the FoxO family are excluded from the nucleus (Hedrick et al., 2012). In line with a role for TCR signaling in the modulation of Ly-6C expression in CD4 Treg cells, we found that the proportion of nuclear NFAT2 was augmented and the one of nuclear FoxO1 decreased in Ly-6C⁻ CD4 Treg cells compared to Ly-6C⁺ CD4 Treg cells (Fig. 2C-F). Altogether, our results suggest that Ly-6C⁻ CD4 Treg cells are interacting more strongly than Ly-6C⁺ CD4 T_N cells with MHC class II-expressing cells and are thus receiving stronger or/and more frequent TCR signals than their Ly-6C⁺-cell counterparts. These interactions involved self-peptides at least in lymph nodes and the spleen as in these organs, the proportion of Ly-6C-expressing cells among Treg cells was not affected in germ-free (GF) mice compared to conventional animals (Fig. 2G, 2H).

A greater ability of Ly-6C⁻ CD4 Treg cells to interact with self should have consequences on their behavior in secondary lymphoid organs. We have recently shown that interactions with MHC class II molecules retained Ly-6C⁻ CD4 T_N cells in LNs (Martin et al., 2013). By using the same protocol (Fig. 3A), we analyzed the phenotype of CD4 T cells remaining within LNs after entry blockade. Most CD4 T cells have egressed from LNs 24 hours after entry blockade, (Supplementary Fig. S2). Interestingly, Treg cells were greatly enriched in the remaining CD4 T cells (Fig. 3B). Moreover, 24 hrs after initiating the treatment, almost all LN Treg cells were Ly-6C⁻ (Fig. 3C). At that time, few CD4 T_N cells and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells were remaining in cervical lymph nodes (cLNs) and mLNs. In contrast, an important proportion of Ly-6C⁻ CD4 Treg cells was still present in the same lymph nodes (Fig. 3D). Differences observed between mLNs and cLNs agree with a recent report by Mandl et al. showing that the transit of T cells through mLNs was faster than their transit through peripheral LNs (Mandl et al., 2012).

Several lines of evidence strongly suggest that the expression of Ly-6C by peripheral CD4 Treg cells inversely correlates with their ability to interact with self and that these interactions retain preferentially Ly-6C⁻ CD4 Treg cells within LNs, therefore increasing their transit time.

Activated/Effector CD4 Treg cells are all comprised within Ly-6C⁻ CD4 Treg cells

We then compared the expression of activation markers by Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ Treg cells. We found that Ly-6C⁻ CD4 Treg cells expressed more surface amounts of CD44 and less CD45RB and CD62L than both Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and CD4 T_N cells (Fig. 4A). Moreover, nearly all CD69-expressing Treg cells were comprised within the Ly-6C⁻ fraction. In line with their activated phenotype, an important proportion of Ly-6C⁻ CD4 Treg cells expressed Ki-67, a marker of proliferating cells (Fig. 4B).

In the last decade, several markers including CD103, ICOS and TNFR2 have been shown to dichotomize the CD4 Treg-cell compartment (Banz et al., 2003; Chen and Oppenheim, 2011; Chen et al., 2008; Chen et al., 2012). Interestingly, all CD103⁻, ICOS⁻ and TNFR2-expressing Treg cells were comprised within Ly-6C⁻ CD4 Treg cells (Supplementary Fig. S3). More recently, it was shown that subsets of CD4 Tregs cells named effector Treg cells (eTreg cells) were expressing transcription factors typically associated with differentiation of conventional T cells (Cretney et al., 2013; Cretney et al., 2011). More precisely, CD4 eTreg cells expressing one given transcription factor would be specialized in the suppression of the helper T cells expressing the same transcription factor. T-bet⁻, IRF4⁻, ROR γ t/ROR α ⁻ and Bcl6-expressing Treg cells would be thus specialized in controlling Th1, Th2, Th17 and TFH effector CD4 T cells respectively. All of these transcription factors were more expressed in Ly-6C⁻ CD4 Treg cells than in both Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and CD4 T_N cells (Fig. 4C). Blimp-1, a master regulator of terminal B-cell differentiation, has been described to be common to all eTreg cell-lineages (Cretney et al., 2013) and was also found to be more transcribed in Ly-6C⁻ CD4 Treg cells (Fig. 4C). CXCR3 expression that characterized eTreg cells controlling Th1-cell responses was restricted to Ly-6C⁻ CD4 Treg cells (Fig. 4D). Finally, only Ly-6C⁻ CD4 Treg cells expressed KLRG1 that has been described as characterizing terminally differentiated eTreg cells (Cheng et al., 2012) (Supplementary Fig. S3).

Only Ly-6C⁻ CD4 Treg cells display suppressive functions *in vitro* and *in vivo*

We then compared the suppressive capacities of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells. Interestingly, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells failed to suppress the proliferative response of conventional CD4 T cells to anti-CD3 stimulation (Fig. 5A). We then tested whether Ly-6C⁺ CD4 Treg cells were also lacking suppressive capacities *in vivo*. CD4 T_N cells were injected alone or together with Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 Treg cells into CD3ε^{-/-} mice (Fig. 5B). T cell-deficient recipient mice injected with CD4 T_N cells alone developed with time a severe wasting disease [Fig. 5C and (Martin et al., 2004)]. Whereas Ly-6C⁻ CD4 Treg cells efficiently inhibited development of the disease, co-injection of Ly-6C⁺ CD4 Treg cells did not rescue recipient mice. Accordingly, histological colitis scores (determined 7 weeks after transfer by examination of colon sections) were quite similar whether or not CD4 T_N cells were injected alone or together with Ly-6C⁺ CD4 Treg cells (Fig. 5D). In secondary lymphoid organs, expansion of naïve CD4 T cells was less efficiently controlled by Ly-6C⁺ CD4 Treg cells than by Ly-6C⁻ CD4 Treg cells (Fig. 5E, left panels). These differences did not mirror a differential expansion of Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ Treg cells in response to lymphopenia as the absolute numbers of Treg cells recovered from the secondary lymphoid organs of recipient mice were similar whatever their initial Ly-6C expression (Fig. 5E, right panels).

We then compared the phenotype of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells with respect to molecules known to play a role in their suppressive capacities. More precisely, we tested CD25 as it allows Treg cells to deprive responder cells of their own IL-2, CD39 and CD73, 2 ectoenzymes that catalyze the generation of adenosine, CTLA-4 that allows the depletion of costimulatory molecules at the cell surface of antigen-presenting cells and PD-L1 that decreases T cell-activation through interaction with its receptor (Tang and Bluestone, 2008). All of these molecules were found to be upregulated in Ly-6C⁻ CD4 Treg cells when compared to their Ly-6C⁺-cell counterparts (Fig. 6A). Importantly, Foxp3 expression itself was similar in Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells (Fig. 6A). Unlike Ly-6C⁻ CD4 Treg cells, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells did not transcribe more efficiently than CD4 T_N cells several genes encoding for soluble factors (EBI3, IL-10, granzyme B, galectin-1 and TGF-β) involved in the suppression of immune responses (Fig. 6B). At the protein level, we confirmed that Ly-6C⁻ cells were the sole Treg cells producing IL-10 upon activation (Supplementary Fig. S4). Of note, while they did not produce IL-10, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells were still unable to produce IL-2, IL-17 or IFN-γ (Supplementary Fig. S4).

Rapid decline of peripheral Ly-6C⁺ CD4 Treg cell-numbers with age

We then decided to study the impact of ageing in the homeostasis of peripheral CD4 Treg cells with respect to their expression of Ly-6C. Interestingly, the proportion of Treg cells expressing Ly-6C decreased with age and nearly no Ly-6C⁺ CD4 Treg cells were detected in the secondary lymphoid organs of 18 month-old mice (Fig. 7A). More precisely, we found that absolute numbers of both CD4 T_N cells and Ly-6C⁺ regulatory CD4 T cells gradually decreased with age in lymph nodes and spleen with a similar rate (Fig. 7B). In sharp contrast, absolute numbers of Ly-6C⁻ CD4 Treg cells only slowly decreased in lymph nodes and even increased with age in the spleen.

Ly-6C⁺ CD4 Treg-cell disappearance with age could either reflect their death or Ly-6C down-regulation on all CD4 Treg cells due to changes in their environment. To address this issue, we first purified Ly-6C⁻ CD4 Treg cells from one year-old mice and transferred them into 4 week-old young animals (Fig. 7C). Three weeks later, all transferred Treg cells were still lacking Ly-6C expression (Fig. 7D). These results strongly suggest that changes in Ly-6C expression with age do not derive from differences between young versus aged environment but rather reflect the death of Ly-6C⁻ CD4 Treg cells. Finally, we purified Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and transferred them into mice expressing or lacking MHC class II molecules (Fig. 7E). 4 weeks later, after Ly-6C⁻ CD4 Treg-cell injection, far more cells were recovered from MHC class II-competent than from MHC class II-deficient recipient mice (Fig. 7F). In contrast, when Ly-6C⁺ CD4 Treg cells were transferred, absolute numbers of recovered cells remained similarly low whether or not recipient mice were expressing MHC class II molecules.

DISCUSSION

We have recently shown that Ly-6C expression allows to dichotomize the CD4 T_N-cell compartment into two cell-subsets with distinct self-reactivity (Martin et al., 2013). Here, we show that peripheral Tregs are also heterogeneous for Ly-6C expression with around 30% of them expressing Ly-6C in secondary lymphoid organs. Ly-6C⁻ CD4 Treg cells express more CD5 and exhibit a higher degree of CD3 ζ phosphorylation than their Ly-6C⁺ cell counterparts. Moreover, Ly-6C⁻ CD4 Treg cells are retained preferentially within LNs after entry blockade. Finally, the subcellular localization of FoxO and NFAT transcription factors differs between the two subsets. More precisely, Ly-6C⁻ cells exhibit a cellular distribution of these factors that fits with recent TCR signaling events. Thus, altogether, our data strongly suggest that among the peripheral CD4 Treg-cell compartment, Ly-6C⁻ cells are interacting more strongly with MHC class II molecules than Ly-6C⁺ cells. In CD4 T_N cells, while impacting on their functionality, TCR signaling derived from self-recognition, known as tonic signaling, is below their activation threshold (Garbi et al. 2012; Stefanova et al., 2003). In CD4 Treg cells, it is more likely than the TCR signals perceived by Ly-6C⁻ cells would be above their activation threshold as Ly-6C⁻ CD4 Treg cells exhibit an activated phenotype and an important proportion of them is cycling as assessed by KI-67 staining. These results agree with a previous report from Fisson et al. showing that the Treg cell pool comprises activated proliferating cells in the steady state (Fisson et al., 2003). In lymph-nodes and spleen, the percentage of Ly-6C⁻ cells does not vary whether or not mice are bred under germ-free conditions. Thus, although in tissues, particularly at environmental interfaces, Ly-6C⁻ CD4 Treg cells may be specific for commensal bacteria-derived peptides, self-peptides would be the main ligands recognized by these cells in LNs and spleen. Thus, the two thirds of the CD4 Treg-cell pool in secondary lymphoid organs correspond to autoreactive cells perceiving signals from self-recognition above their activation threshold.

We have recently shown that CD4 Treg cells transferred 5 days into recipient mice lacking the expression of MHC class II molecules exhibit significantly diminished suppressive capacities (Delpoux et al., 2012). Here, we extend these results by demonstrating that lowly self-reactive CD4 Treg cells (Ly-6C⁺) can be characterized in the periphery of unmanipulated young mice and that such cells lack suppressive abilities *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells express similar amounts of Foxp3. Thus, although TCR signals are not required for maintaining Foxp3 expression in peripheral CD4 Treg cells, they are mandatory for their suppressive abilities. Magg et al. have recently shown that human

activated conventional T cells expressing low levels of Foxp3 do not display suppressive functions as Foxp3 is, in these cells, mainly expressed in the cytoplasm and not in the nucleus (Magg et al., 2012). We did not observe such a differential subcellular localization of Foxp3 between Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells. Indeed, in both subsets, Foxp3 is nearly exclusively found in the nucleus (Fig. 2C, 2E). Thus, Foxp3 nuclear expression, although necessary, is not sufficient to maintain the suppressive functions of peripheral Treg cells. TCR signals in Ly-6C⁻ CD4 Treg cells lead to the relocalization of transcription factors including FoxO and NFAT. Differential subcellular localization of transcription factors between Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells may lead to differential expression of proteins including key immunosuppressive molecules. For example, NFAT has been shown to play an important role in CTLA-4 expression (Gibson et al., 2007; Wu et al., 2006). Thus, NFAT translocation into the nucleus in Ly-6C⁻ CD4 Treg cells may account for their enhanced expression of CTLA-4 when compared to Ly-6C⁺ CD4 Treg cells. TCR signals may thus play a role in setting the suppressive capacities of Foxp3-expressing cells through modulating the activity of other transcription factors than Foxp3 itself. However, we cannot exclude that the relationship between TCR signaling and CD4 Treg-cell suppressive capacities would depend partially on Foxp3 transcriptional activity. Indeed, several studies have shown that post-translational modifications of Foxp3 such as acetylation or phosphorylation can modulate its function without affecting its expression or localization (Liu et al., 2013; Nie et al., 2013).

In contrast to the peripheral CD4 T_N cell-compartment that gradually diminishes in number with age, the absolute number of CD4 Treg cells in secondary lymphoid organs remains mostly constant throughout life. More precisely, Ly-6C⁻ CD4 Treg cells are cycling cells which half-life depends on interactions with self as, 4 weeks after their transfer, far more Ly-6C⁻ CD4 Treg cells were recovered from the periphery of MHC class II expressing recipient mice when compared to recipient mice lacking the expression of these molecules. On the other hand, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells are mostly resting and their survival does not depend on TCR signaling events as similar numbers of Ly-6C⁺ CD4 Treg cells were recovered 4 weeks after transfer into recipient mice lacking or expressing MHC class II molecules. TCR signals may act directly on CD4 Treg-cell survival and/or indirectly by boosting IL-2 production by conventional peripheral T cells. Indeed, IL-2 is known to play a crucial role in CD4 Treg-cell homeostasis and to induce their proliferation (Le Champion et al., 2012; Boyman and Sprent, 2012). However, the results of our transfer experiments reveal that only Ly-6C⁻ CD4 Treg cells are sensitive to the pro-survival consequences of self-recognition. As a result, they

maintain their numbers with age while Ly-6C⁺ CD4 Treg cells gradually disappear. Thus, although quantitatively stable, the CD4 Treg-cell pool is qualitatively enriched with age in highly self-reactive and suppressive cells.

Our recent achievements have demonstrated that Ly-6C expression allows the discrimination of lowly and highly self-reactive CD4 T_N and Treg cells in the periphery [(Martin et al., 2013) and the present manuscript]. Using this new tool, we have obtained data strongly suggesting that CD4 T_N cells with the highest avidity for self are prone to differentiate into iTreg cells and that self-recognition events are required to set-up and/or maintain the suppressive capacities of CD4 Treg cells. Thus, autoreactivity increases the iTreg-cell differentiation potential of CD4 T_N cells and maintain the functional program of Treg cells. These unexpected consequences of self-recognition reveal virtuous circles that allows autoreactivity to control its potential harmful consequences such as the anti-self responses that would lead to autoimmunity.

METHODS

Mice

C57BL/6 mice (CD45.2) were obtained from Charles River Laboratories. C57BL/6 CD45.1 mice and C57BL/6 CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice were maintained in our own animal facilities, under specific pathogen-free conditions. C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice were initially obtained from Dr. Bernard Malissen, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, France (Wang et al., 2008). C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice were then crossed with C57BL/6 CD45.1 mice to generate C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice. C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice were crossed with C57BL/6 MHC II $^{\Delta/\Delta}$ mice (Madsen et al., 1999) to obtain C57BL/6 Foxp3-GFP MHC II $^{\Delta/\Delta}$ CD45.1 mice. C57BL/6 Germ Free mice (GF) and the related control C57BL/6 SPF mice were obtained from CDTA Orléans. Donor and recipient mice were sex-matched. 4- to 6-week-old mice were used for experiments unless otherwise indicated. Experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Veterinary Department. All procedures performed were approved by the Paris-Descartes Ethical Committee for Animal Experimentation (decision CEEA34.BL.002.12).

Cell suspensions

Peripheral LNs (pLNs), mesenteric LNs (mLNs), cervical LNs (cLNs), Peyer's Patches (PP), spleen and thymus were homogenized and passed through a nylon cell strainer (BD Falcon) in RPMI 1640 Glutamax (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Biochrom) for adoptive transfer and cell culture (LNs only), or in 5% FCS, 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) in phosphate saline buffer saline (PBS), for flow cytometry.

Tissue processing

For all tissue processing, ketamine-xylazine anesthetized mice were first perfused intracardiacally with cold PBS. Small intestines were opened longitudinally after removal of PP, washed in successive HBSS 5% FCS baths and incubated in RPMI 1640 20%, with collagenase D (Roche) 1mg/ml and DnaseI (Roche) 0,1mg/ml for 30 min at 37°C. Cells were then recovered after Percoll gradient separation (40-70%).

Cell surface staining and flow cytometry

Cell suspensions were collected and dispensed into 96-well round-bottom microtiter plates (Greiner Bioscience; 6x10⁶ cells/well). Surface staining was performed as previously described (Le Champion et al., 2012; Pommier et al., 2013). Briefly, cells were incubated on

ice, for 15 minutes per step, with Abs in 5% FCS (Biochrom), 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) PBS. Each cell-staining reaction was preceded by a 15-minute incubation with a purified anti-mouse CD16/32 Ab (FcγRII/III block; 2.4G2). For determination of intracellular cytokine production, cells were stimulated with 0.5 µg/ml PMA (Sigma-Aldrich), 0.5 µg/ml ionomycin (Sigma-Aldrich), and 10 µg/ml BrefeldinA (Sigma-Aldrich) for 2 hrs at 37°C. Cells were then stained for surface markers, fixed in 2% paraformaldehyde in PBS, and permeabilized with 0.5% saponin, followed by labeling with specific cytokine Abs. For Foxp3, CTLA-4 and Ki-67 intracellular staining, the Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) was used. Multi-color immunofluorescence was analyzed using a BD-LSR2 cytometer (BD Biosciences). List-mode data files were analyzed using Diva software (BD Biosciences). Data acquisition and cell sorting were performed on the Cochin Immunobiology facility.

Adoptive transfer of CD4 Treg cells

CD4 T cells were purified from LNs (pooled superficial cervical, axillary, brachial, inguinal, and mesenteric LNs) or thymi of C57BL/6 Foxp3-GFP mice by incubating cell suspensions on ice for 20 minutes with a mixture of anti-CD8 (53-6.7), anti-CD11b (Mac-1) and anti-CD19 (1D3) Abs obtained from hybridoma supernatants, and then with magnetic beads coupled to anti-rat immunoglobulins (DynaL Biotech). Purified CD4 T cells were then labeled with biotinylated anti-Ly-6C (AL21), from BD biosciences, and Pacific Blue-conjugated streptavidin (Invitrogen). Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells were flow cytometry sorted as GFP⁺ cells using a FACS-ARIA3 flow cytometer (BD Biosciences), and injected intravenously into sex-matched recipient mice.

***In vitro* suppression assay**

Purified Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 Treg cells were flow-cytometry sorted and the suppressive capacities of these highly purified Foxp3 expressing cells were then assessed as previously described (Delpoux et al., 2012). Briefly, conventional CD4 T cells (GFP⁻ CD4⁺ T cells) were purified from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice, labeled with Cell Trace Violet (CTV; Invitrogen) and stimulated for 64 hours, alone or together with CD4 Treg cells at various Treg/Tconv-cell ratios.

***In vivo* suppression assay: colitis model**

CD4 Treg cells were purified from C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice as described above. CD4 T_N cells were purified from C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 as previously described (Martin et al., 2013). 5.10⁵ CD4 T_N cells were injected intravenously into sex-matched

recipient mice alone or together with $5 \cdot 10^4$ Ly-6C⁺ or Ly-6C⁻ CD4 Treg cells. The weight of recipient mice was monitored every two days and mice were sacrificed either 7 weeks after transfer or when reaching 80% of their initial weight.

Colitis scoring

For the colitis model, colons were removed and fixed in PBS containing 10% formaldehyde. Five-micrometer paraffin-embedded sections were cut and stained with H&E and then blindly analyzed. Each segment was given a score of 0-4: grade 0, no significant changes; grade 1, minimal scattered mucosal inflammatory cell infiltrates, with or without minimal epithelial hyperplasia; grade 2, mild scattered to diffuse inflammatory cell infiltrates, sometimes extending into the submucosa and associated with erosions, with mild to moderate epithelial hyperplasia and mild to moderate mucin depletion from goblet cells; grade 3, moderate inflammatory cell infiltrates that were sometimes transmural, with moderate to severe epithelial hyperplasia and mucin depletion; grade 4, marked inflammatory cell infiltrates that were often transmural and associated with crypt abscesses and occasional ulceration, with marked epithelial hyperplasia, mucin depletion, and loss of intestinal glands.

Blocking T-cell entry into LNs

C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p. with 200 μ g of anti- α L and anti- α 4 Abs (BioXcell) to block LN entry. 24 hours later, cervical LNs (cLNs), mesenteric LNs (mLNs) and spleen were harvested and CD4 T cells were analyzed.

Immunoblot Analysis

Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells ($3 \cdot 10^5$ cells/condition) were flow cytometry sorted as described above, washed in ice-cold PBS and lysed in lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8.0), 5 mM NaPiP, 1 mM, Na₃VO₄, 20 mM NaPO₄ (pH 7.6), 3 mM β -glycerophosphate, 10 mM NaF, 1% Triton X-100, complete protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche)) for 15 min on ice. Samples were centrifugated and whole cell lysates harvested. Unreduced proteins were separated on a 12% SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and immunoblotted first with an anti-Phosphotyrosine Ab (Clone 4G10, Millipore) and, after stripping, with an anti-CD3 ζ Ab (Clone 6B10.2, Santa Cruz Biotechnology). Signals were quantified using the Image J software. The ratio p ζ / ζ was estimated as previously described (Dorfman et al., 2000; Martin et al., 2006).

Immunofluorescence microscopy

Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells were then flow cytometry sorted as described above. Cells were put on coated Poly-D lysine coverslides for 20 min at Room Temperature (RT). For NFAT staining, CD4 Treg cells were fixed with the Fix/Perm Buffer of the Foxp3 staining set (eBioscience) for 1h at 4°C and permeabilized with the Perm Buffer of the Foxp3 staining set. Cells were then incubated with anti-NFAT2 (7A6, BD Bioscience) and anti-Foxp3 (FJK-16s, e-Bioscience) Abs together with Phalloidin (Invitrogen) for overnight at 4°C followed by DAPI staining (Invitrogen). For FoxO1 staining, CD4 Treg cells were fixated with 2% paraformaldehyde for 30 min at RT and permeabilized with Triton 0,2% (Sigma-Aldrich). Cells were then incubated with anti-FoxO1 (C29H4, Cell signaling) and anti-Foxp3 Abs together with Phalloidin for overnight at 4°C followed by DAPI staining. Slides were mounted with ProLong Gold[®] antifade reagent (Invitrogen). Stained CD4 Treg cells were photographed on a Yokogawa Spinning-disk confocal microscope with a 100x oil immersion objective connected to a digital video camera and analyzed using Image J software.

qRT-PCR analysis

Total RNA was isolated from flow cytometry sorted cells as described above and reverse transcribed with SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen) using 100ng Random Hexamers. Quantitative PCR analysis was performed using Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and a real-time PCR system (ABI7300; Applied Biosystems) according to standard PCR conditions. For quantitative calculations, results were normalized to hprt expression. Primers used are:

Genes	sequence 5'→3'
<i>Ebi3 forward</i>	5'-TTGTGGCTGAGCGAATC-3'
<i>Ebi3 reverse</i>	5'-GCGGAGTCGGTACTTGA-3'
<i>Gzmb forward</i>	5'-CTCCACGTGCTTTCACCAAA-3'
<i>Gzmb reverse</i>	5'-AGGATCCATGTTGCTTCTGTAGTTAG-3'
<i>Hprt forward</i>	5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3'
<i>Hprt reverse</i>	5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3'
<i>Il10 forward</i>	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'
<i>Il10 reverse</i>	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
<i>Lgals1 forward</i>	5'-GTCGCCAGCAACCTGAATCTC-3'
<i>Lgals1 reverse</i>	5'-GGGCATTGAAGCGAGGATTG-3'
<i>Tgfb1 forward</i>	5'-CGCAACAACGCCATCTATGA-3'
<i>Tgfb1 reverse</i>	5'-GCACTGCTTCCCGAATGTCT-3'
<i>Tbx21 forward</i>	5'-ACCAGAGCGGCAAGTGGG-3'
<i>Tbx21 reverse</i>	5'-TGGACATATAAGCGGTTCCCTG-3'

<i>Rora forward</i>	5'-GCCCTTCAGCACGTCCTACAG-3'
<i>Rora reverse</i>	5'-TCCACATAGGGCTCTTAACGTAGA-3'
<i>Rorc forward</i>	5'-CCGCTGAGAGGGCTTCAC-3'
<i>Rorc reverse</i>	5'-TGCAGGAGTAGGCCACATTACA-3'
<i>Bcl6 forward</i>	5'-CACACCCGTCCATCATTGAA-3'
<i>Bcl6 reverse</i>	5'-TGTCCCTCACGGTGCCTTTTT-3'
<i>Irf4 forward</i>	5'-GCCCAGCAGGTTTCATAACTACAT-3'
<i>Irf4 reverse</i>	5'-GCCAAACGTCACAGGACATTGATA-3'
<i>Prdm1 forward</i>	5'-TTCTTGTTGGTATTGTCGGGACTT-3'
<i>Prdm1 reverse</i>	5'-TTGGGGACACTCTTTGGGTAGAGTT-3'

Statistics

Data are expressed as mean \pm SEM, and the significance of differences between two series of results was assessed using the student's unpaired or paired t test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Microscopy quantification analyses were performed using Mann-Whitney non-parametric t test with. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically correlated. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

REFERENCES

- Banz, A., Peixoto, A., Pontoux, C., Cordier, C., Rocha, B., and Papiernik, M. (2003). A unique subpopulation of CD4⁺ regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *Eur J Immunol* 33, 2419-2428.
- Bautista, J.L., Lio, C.W., Lathrop, S.K., Forbush, K., Liang, Y., Luo, J., Rudensky, A.Y., and Hsieh, C.S. (2009). Intracloal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus. *Nat Immunol* 10, 610-617.
- Bilate, A.M., and Lafaille, J.J. (2012). Induced CD4(+)Foxp3(+) Regulatory T Cells in Immune Tolerance. *Annu Rev Immunol* 30, 733-758.
- Boyman, O., and Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12, 180-190.
- Chen, X., and Oppenheim, J.J. (2011). Resolving the identity myth: key markers of functional CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* 11, 1489-1496.
- Chen, X., Subleski, J.J., Kopf, H., Howard, O.M., Mannel, D.N., and Oppenheim, J.J. (2008). Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol* 180, 6467-6471.
- Chen, Y., Shen, S., Gorenlla, B.K., Gao, J., and Zhong, X.P. (2012). Murine regulatory T cells contain hyperproliferative and death-prone subsets with differential ICOS expression. *J Immunol* 188, 1698-1707.
- Cheng, G., Yuan, X., Tsai, M.S., Podack, E.R., Yu, A., and Malek, T.R. (2012). IL-2 receptor signaling is essential for the development of Klrp1⁺ terminally differentiated T regulatory cells. *J Immunol* 189, 1780-1791.
- Cretney, E., Kallies, A., and Nutt, S.L. (2013). Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends Immunol* 34, 74-80.
- Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., and Kallies, A. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol* 12, 304-311.
- Delpoux, A., Poitrasson-Riviere, M., Le Campion, A., Pommier, A., Yakonowsky, P., Jacques, S., Letourneur, F., Randriamampita, C., Lucas, B., and Auffray, C. (2012). Foxp3-independent loss of regulatory CD4⁺ T-cell suppressive capacities induced by self-deprivation. *Eur J Immunol* 42, 1237-1249.
- Dorfman, J.R., Stefanova, I., Yasutomo, K., and Germain, R.N. (2000). CD4⁺ T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling. *Nat Immunol* 1, 329-335.
- Fisson, S., Darrasse-Jeze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R., and Salomon, B.L. (2003). Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198, 737-746.
- Garbi, N., Hammerling, G.J., Probst, H.C., and van den Broek, M. Tonic T cell signalling and T cell tolerance as opposite effects of self-recognition on dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 22, 601-608.
- Gibson, H.M., Hedgcock, C.J., Aufiero, B.M., Wilson, A.J., Hafner, M.S., Tsokos, G.C., and Wong, H.K. (2007). Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *J Immunol* 179, 3831-3840.
- Gottschalk, R.A., Corse, E., and Allison, J.P. (2010). TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J Exp Med* 207, 1701-1711.
- Hedrick, S.M., Michelini, R.H., Doedens, A.L., Goldrath, A.W., and Stone, E.L. (2012). FOXO transcription factors throughout T cell biology. *Nat Rev Immunol* 12, 649-661.
- Hsieh, C.S., Liang, Y., Tzysnik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity* 21, 267-277.
- Hsieh, C.S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7, 401-410.
- Le Campion, A., Pommier, A., Delpoux, A., Stouvenel, L., Auffray, C., Martin, B., and Lucas, B. (2012). IL-2 and IL-7 determine the homeostatic balance between the regulatory and conventional CD4⁺ T cell compartments during peripheral T cell reconstitution. *J Immunol* 189, 3339-3346.
- Leung, M.W., Shen, S., and Lafaille, J.J. (2009). TCR-dependent differentiation of thymic Foxp3⁺ cells is limited to small clonal sizes. *J Exp Med* 206, 2121-2130.

- Liu, X., Nguyen, P., Liu, W., Cheng, C., Steeves, M., Obenauer, J.C., Ma, J., and Geiger, T.L. (2009). T cell receptor CDR3 sequence but not recognition characteristics distinguish autoreactive effector and Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunity* 31, 909-920.
- Liu, Y., Wang, L., Predina, J., Han, R., Beier, U.H., Wang, L.C., Kapoor, V., Bhatti, T.R., Akimova, T., Singhal, S., *et al.* (2013). Inhibition of p300 impairs Foxp3(+) T regulatory cell function and promotes antitumor immunity. *Nat Med* 19, 1173-1177.
- Madsen, L., Labrecque, N., Engberg, J., Dierich, A., Svejgaard, A., Benoist, C., Mathis, D., and Fugger, L. (1999). Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10338-10343.
- Magg, T., Mannert, J., Ellwart, J.W., Schmid, I., and Albert, M.H. (2012). Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur J Immunol* 42, 1627-1638.
- Mandl, J.N., Liou, R., Klauschen, F., Vrisekoop, N., Monteiro, J.P., Yates, A.J., Huang, A.Y., and Germain, R.N. (2012). Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naive CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 18036-18041.
- Martin, B., Auffray, C., Delpoux, A., Pommier, A., Durand, A., Charvet, C., Yakonowsky, P., de Boysson, H., Bonilla, N., Audemard, A., *et al.* (2013). Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nat Commun* 4, 2209.
- Martin, B., Banz, A., Bienvenu, B., Cordier, C., Dautigny, N., Becourt, C., and Lucas, B. (2004). Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo. *J Immunol* 172, 3391-3398.
- Martin, B., Becourt, C., Bienvenu, B., and Lucas, B. (2006). Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4+ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood* 108, 270-277.
- Müller, M.R., and Rao, A. (2010). NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10, 645-656.
- Nie, H., Zheng, Y., Li, R., Guo, T.B., He, D., Fang, L., Liu, X., Xiao, L., Chen, X., Wan, B., *et al.* (2013). Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 19, 322-328.
- Pommier, A., Audemard, A., Durand, A., Lengagne, R., Delpoux, A., Martin, B., Douguet, L., Le Campion, A., Kato, M., Avril, M.F., *et al.* (2013). Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 13085-13090.
- Sakaguchi, S. (2000). Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr Opin Immunol* 12, 684-690.
- Shevach, E.M. (2000). Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 18, 423-449.
- Stefanova, I., Dorfman, J.R., Tsukamoto, M., and Germain, R.N. (2003). On the role of self-recognition in T cell responses to foreign antigen. *Immunol Rev* 191, 97-106.
- Tang, Q., and Bluestone, J.A. (2008). The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 9, 239-244.
- Wang, Y., Kissenpfennig, A., Mingueneau, M., Richelme, S., Perrin, P., Chevrier, S., Genton, C., Lucas, B., Disanto, J.P., Acha-Orbea, H., *et al.* (2008). Th2 Lymphoproliferative Disorder of LatY136F Mutant Mice Unfolds Independently of TCR-MHC Engagement and Is Insensitive to the Action of Foxp3+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 180, 1565-1575.
- Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., *et al.* (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* 209, 1723-1742, S1721.
- Wong, J., Obst, R., Correia-Neves, M., Losyev, G., Mathis, D., and Benoist, C. (2007). Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 178, 7032-7041.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., *et al.* (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126, 375-387.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., *et al.* (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* 209, 1713-1722, S1711-1719.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly acknowledge E. Maillard, K. Labroquère and M. Andrieu from the Cochin Immunobiology facility, B. Durel, T. Guilbert and P. Bourdoncle from the Cochin Cellular Imaging facility. This work was supported by grants from the “Ligue contre le Cancer” and the “Association pour la Recherche contre le Cancer”. A. Delpoux and A. Pommier were supported by a PhD fellowship from the “Association pour la Recherche sur le Cancer”.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.D., C.A. and B.L. designed experiments. A.D. P.Y., C.C., M.V., A.P., A.D. and B.M. did the experiments. A.D., C.A. and B.L wrote the paper.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CD4 Treg cells can be subdivided into two subsets on the basis of Ly-6C expression. (A) Ly-6C fluorescence histograms of CD4 Treg cells ($CD4^+ CD8\alpha^- TCR\beta^+ Foxp3^+$ T cells) recovered from peripheral LNs (pLNs), mesenteric LNs (mLNs), spleen and thymus are shown for a representative C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. Numbers in each histogram represent the percentage of Ly-6C⁺ cells among CD4 Treg cells. (B-C) 2.5×10^5 flow-cytometry sorted thymic Ly-6C⁻ CD4 Treg cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected i.v into C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice lacking or expressing MHC class II molecules (MHC-II⁻ and MHC-II⁺, respectively). (B) Diagram illustrating the experimental model. (C) Ly-6C expression by CD45.2⁺ CD4 Treg cells recovered from total LNs of recipient mice 7, 14 and 28 days after transfer is shown. Results are representative of at least 6 mice from 2 independent experiments. (D) Neuropilin-1 (Nrp-1) fluorescence histograms of CD4 Treg cells recovered from pLNs, mLNs, Peyer's Patches (PP) and Small Intestine (SI) are shown for a representative C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. (E) Proportions of Ly-6C⁺ cells among Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ CD4 Treg cells recovered from pLNs, mLNs, PP and SI of C57BL/6 Foxp3-GFP mice are shown as means \pm SEM for 8 mice from 2 independent experiments.

Figure 2: Ly-6C expression in CD4 Treg cells inversely correlates with their ability to interact with self. (A) CD5 fluorescence histograms of Ly-6C⁻ CD4 Treg cells, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and naïve CD4 T cells from LNs of a representative C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. Mean Fluorescence Intensities (MFI) are shown as means \pm SEM for 6 mice from 2 independent experiments. (B). Immunoblot analysis of CD3 ζ protein levels (ζ) and of the extent of CD3 ζ chain phosphorylation (p ζ). Quantification (compared to levels observed in naïve CD4 T cells) are indicated under each band. On the left, the scatter plot represents the ratio p ζ / ζ for naïve CD4 T cells (Black circles), Ly-6C⁻ CD4 Treg cells (white circles) and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells (gray circles). Each dot represents an individual sample. (C) Four-colour staining of F-actin (Phalloidin, blue), DNA (DAPI, white), Foxp3 (red) and NFAT2 (green) of freshly isolated Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells. (D) MFI ratios of nuclear/total NFAT2 are shown. Each dot represents an individual Ly-6C⁻ (white circle) or Ly-6C⁺ (grey circle) cell. (E) Four-colour staining of F-actin (Phalloidin, blue), DNA (DAPI, white), Foxp3 (red) and FoxO1 (green) of freshly isolated CD4 Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ Treg cells. (F) MFI ratios of nuclear/total FoxO1 are shown. Each dot represents an individual Ly-6C⁻ (white

circle) or Ly-6C⁺ (grey circle) cell. (G) Ly-6C fluorescence histograms of CD4 Treg cells recovered from pLNs, mLNs and spleen are shown for a representative C57BL/6 Germ Free (GF) mouse or C57BL/6 Specific Pathogen free (SPF) mouse. (H) Proportions of Ly-6C⁺ cells among CD4 Treg cells recovered from pLNs, mLNs and spleen of C57BL/6 GF mice or C57BL/6 SPF littermate are shown as means \pm SEM for 4 mice from one experiment.

Figure 3: Ly-6C⁻ CD4 Treg cells are preferentially retained within lymph nodes. C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p with 200 μ g of anti- α L and anti- α 4 Abs. 24 hours later, cervical LNs (cLNs), mesenteric LNs (mLNs) and spleen were harvested and CD4 T cells were analyzed. (A) Diagram illustrating the experimental model. (B) Foxp3 expression by CD4 T cells from the indicated organs is shown for treated (+) and untreated (-) mice. (C) Ly-6C fluorescence histograms of CD4 Treg cells recovered from cLNs, mLNs and spleen are shown for representative treated or untreated C57BL/6 Foxp3-GFP mice. (D) Absolute numbers of Ly-6C⁻ CD4 Treg cells, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and naive CD4 T cells in cLNs, mLNs and spleen of treated or untreated mice were calculated. The percentage of recovery was calculated by dividing the absolute numbers in treated mice by the mean absolute number obtained in untreated animals. Results are shown as means \pm SEM for 2 independent experiments.

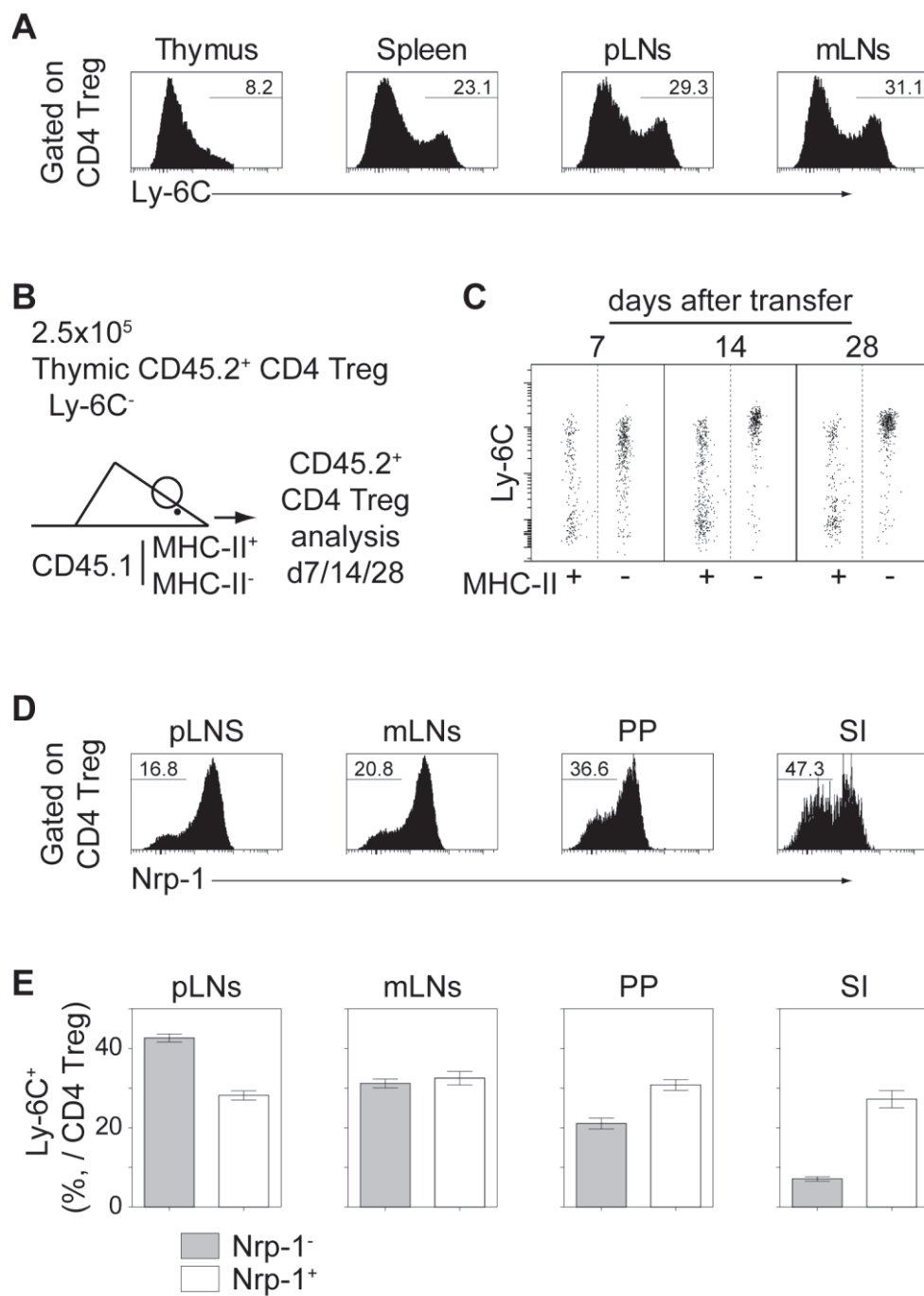
Figure 4: Effector/activated Tregs are comprised within Ly-6C⁻ CD4 Treg cells. (A) CD44, CD69, CD45RB and CD62L fluorescence histograms of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells as well as of naive CD4 T cells recovered from the LNs of a representative C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. (B) Ki-67 expression by LN Ly-6C⁻ CD4 Treg cells, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and naive CD4 T cells is shown for a representative C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. Proportions of Ki-67⁺ cells among LN Ly-6C⁻ CD4 Treg cells, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and naive CD4 T cells are shown as means \pm SEM for 6 C57BL/6 Foxp3-GFP mice from 2 independent experiments. (C) Relative transcript levels of *Tbx21*, *Rora*, *Bcl-6*, *Irf4*, *Rorc* and *Prdm1* genes were analyzed by qRT-PCR in the indicated CD4 T-cell subsets and shown as means \pm SEM for 2 independent experiments. (D) CXCR3 expression by LN Ly-6C⁻ CD4 Treg cells, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and naive CD4 T cells. Proportions of CXCR3⁺ cells among LN Ly-6C⁻ CD4 Treg cells, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and naive CD4 T cells are shown as means \pm SEM for 6 C57BL/6 Foxp3-GFP mice from 2 independent experiments.

Figure 5: *in vitro* and *in vivo* suppressive capacities of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells. (A) LN CD4 Tconv cells (GFP⁻ CD4 T cells) of C57BL/6 Foxp3-GFP mice were flow-cytometry sorted, labeled with CTV, and cultured alone (no Treg) or together with the indicated Treg cells at various Treg/Tconv-cell ratios (1/1, 1/2, 1/4) in the presence of soluble anti-CD3 Ab and antigen-presenting cells. CTV fluorescence histograms of Tconv cells (CTV⁺) are shown 64 h after the beginning of culture. CTV fluorescence histogram in the absence of anti-CD3 stimulation is shown as control (filled histogram). (B-E) 5x10⁵ flow-cytometry sorted naïve CD4 T cells from C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice were injected i.v. into C57BL/6 CD3ε^{-/-} recipient mice alone or together with 5x10⁴ flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 Treg cells from C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice. Seven weeks after transfer, pLNs, mLNs and spleen were recovered separately and analyzed. (B) Diagram illustrating the experimental model. (C) Body weight of recipient mice was monitored up to 7 weeks post-transfer and percentages of initial body weight were calculated and plotted. (D) Colitis scores of recipient mice were assessed 7 weeks after transfer. (E) Absolute numbers of CD4 T cells deriving from initially injected naïve (CD45.1⁺, left) or regulatory (CD45.2⁺, right) CD4 T cells were assessed 7 weeks after transfer and plotted. Each dot represents an individual recipient mouse.

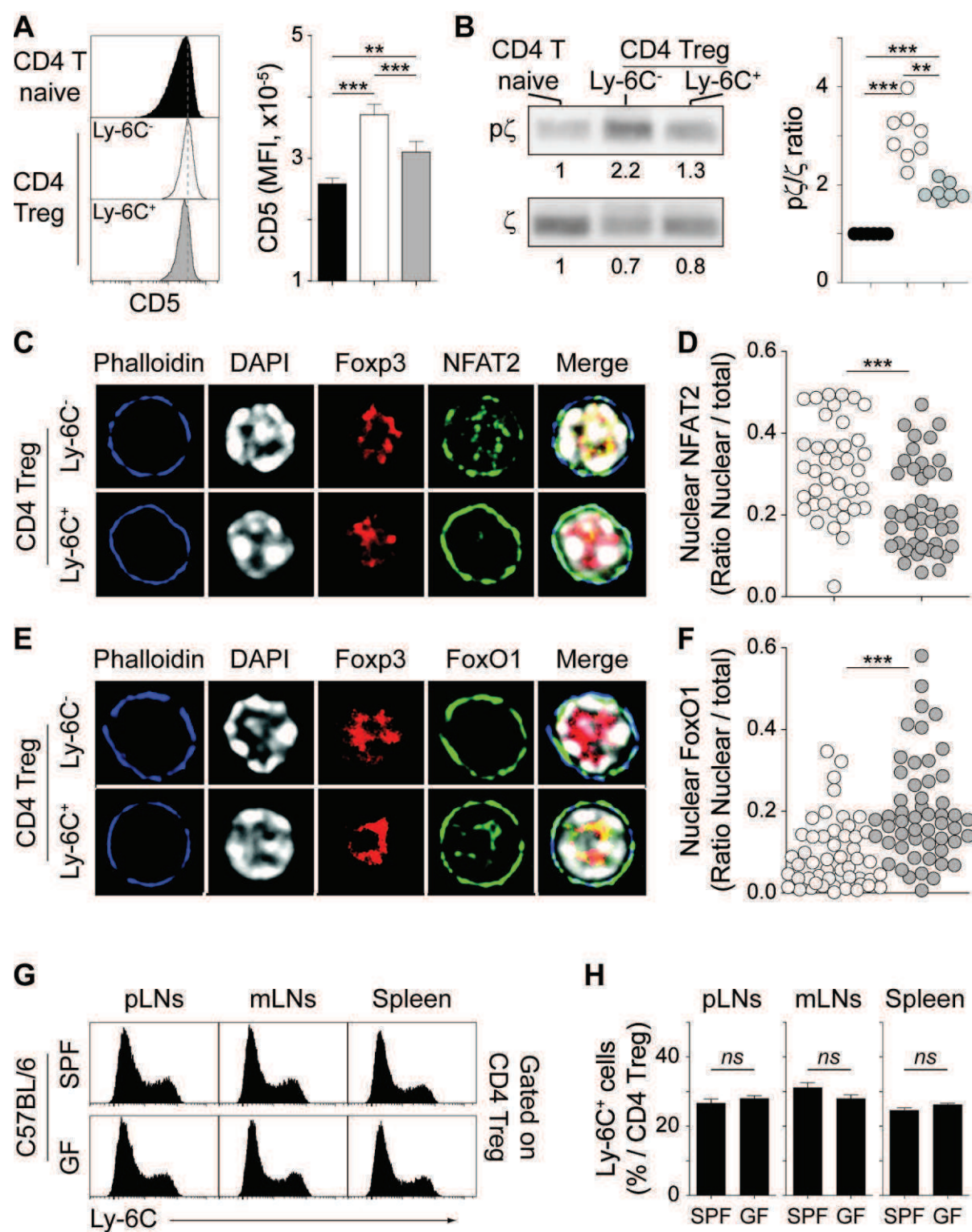
Figure 6: Ly-6C⁻ CD4 Treg cells express higher amounts of key immunosuppressive molecules. (A) Foxp3, CD25, CD39, CD73, CTLA-4 and PD-L1 fluorescence histograms of Ly-6C⁻ CD4 Treg cells, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and naïve CD4 T cells from LNs of a representative C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. (B) Transcript levels of *Ebi3*, *Il10*, *Gzmb*, *Lgals1* and *Tgfb1* genes were analyzed by qRT-PCR for the indicated CD4 T-cell subsets and shown as means ± SEM for 2 independent experiments.

Figure 7: Rapid decline of peripheral Ly-6C⁺ CD4 Treg cell-numbers with age. (A) Ly-6C fluorescence histograms of CD4 Treg cells recovered from LNs of representative 1-, 6-, 12- and 18-month-old C57BL/6 mice. (B) Absolute numbers of Ly-6C⁻ CD4 Treg cells, Ly-6C⁺ CD4 Treg cells and naïve CD4 T cells from LNs and spleen of C57BL/6 mice were calculated. For each subset, ratios were calculated by dividing the absolute numbers at all studied ages by the mean absolute number at 1 month. Results are shown as means ± SEM for at least 4 mice per age group. (C-D) flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ CD4 T cells from LNs of 12-month-old C57BL/6 CD45.2 mice were injected i.v. into 4-week-old C57BL/6 CD45.1 recipient mice. Periphery (LNs + spleen) was harvested 3 weeks after transfer. (C) Diagram

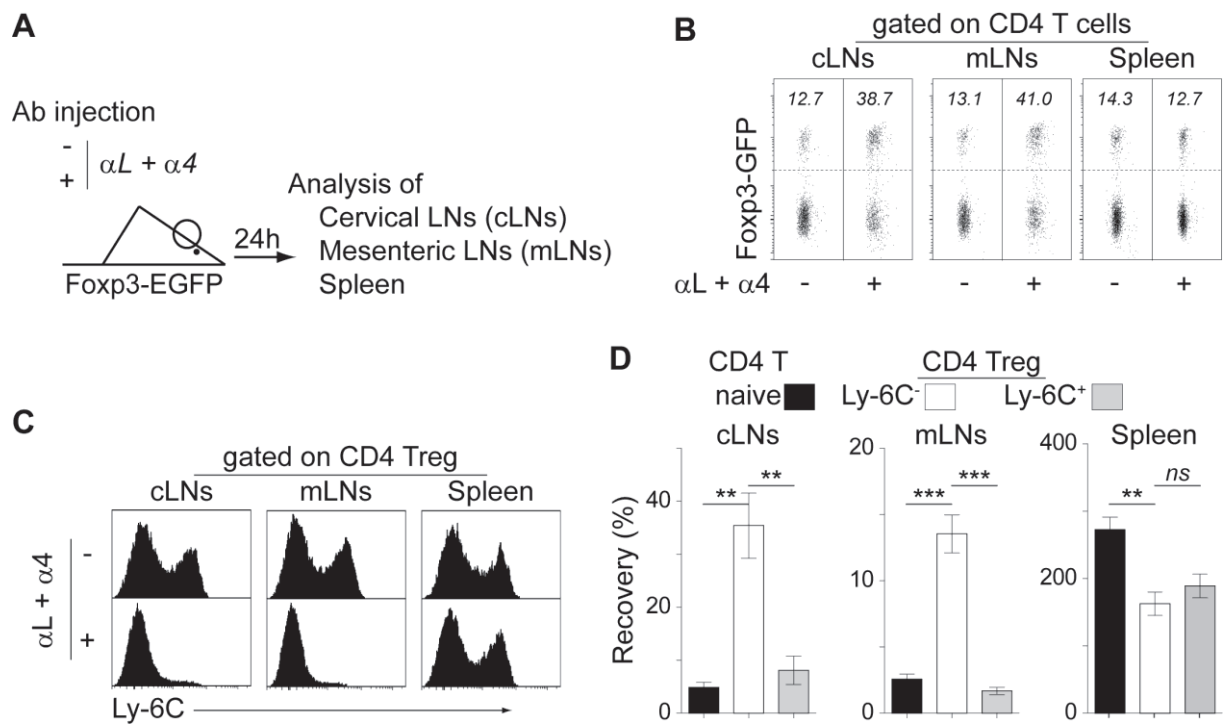
illustrating the experimental model. (D) Ly-6C fluorescence histograms of transferred (CD45.2⁺) and endogenous (CD45.1⁺) CD4 Treg cells recovered from LNs 3 weeks after transfer are shown for a representative C57BL/6 recipient mouse. (E-F) 2.5x10⁵ flow-cytometry sorted Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 Treg cells from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice were injected i.v. into C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice lacking or not expressing MHC class II molecules (MHC-II⁻ and MHC-II⁺, respectively). (E) Diagram illustrating the experimental model. (F) Absolute numbers of CD45.2⁺ CD4 T cells recovered from the periphery (LNs + spleen) of recipient mice 4 weeks after transfer were calculated and plotted. Each dot represents an individual recipient mouse.



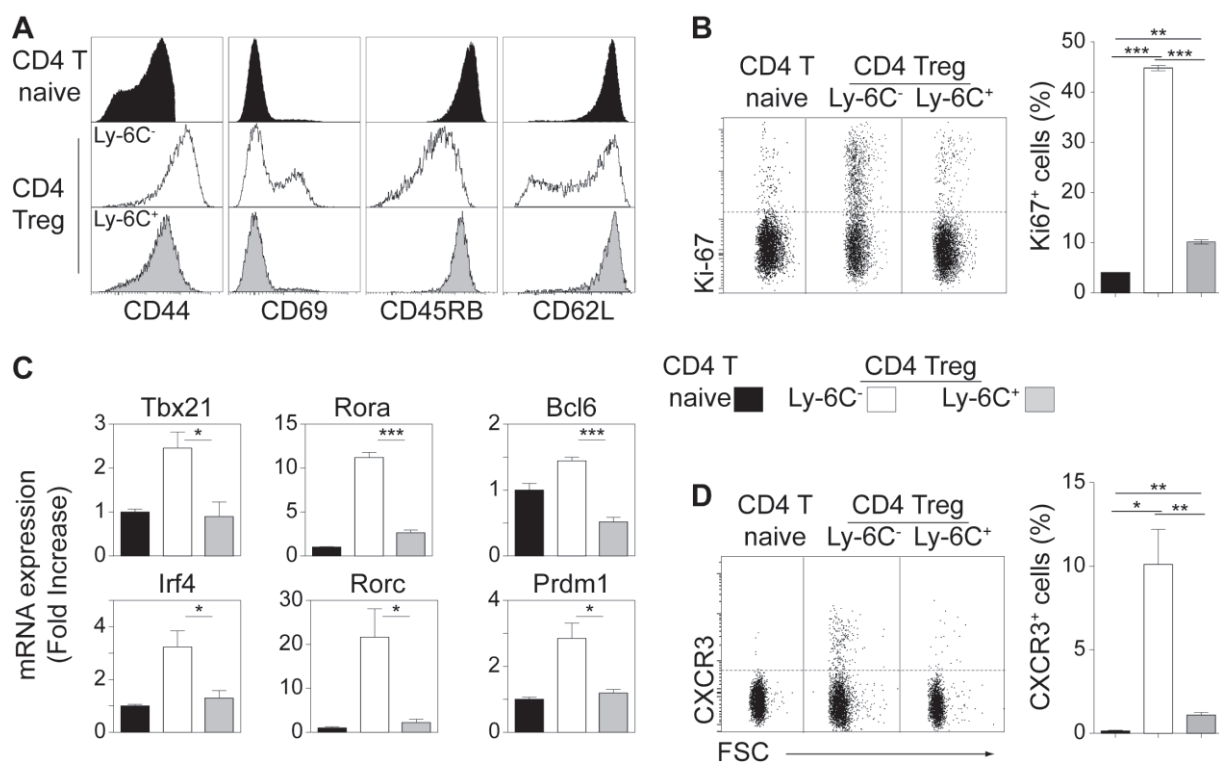
- Figure 1 -



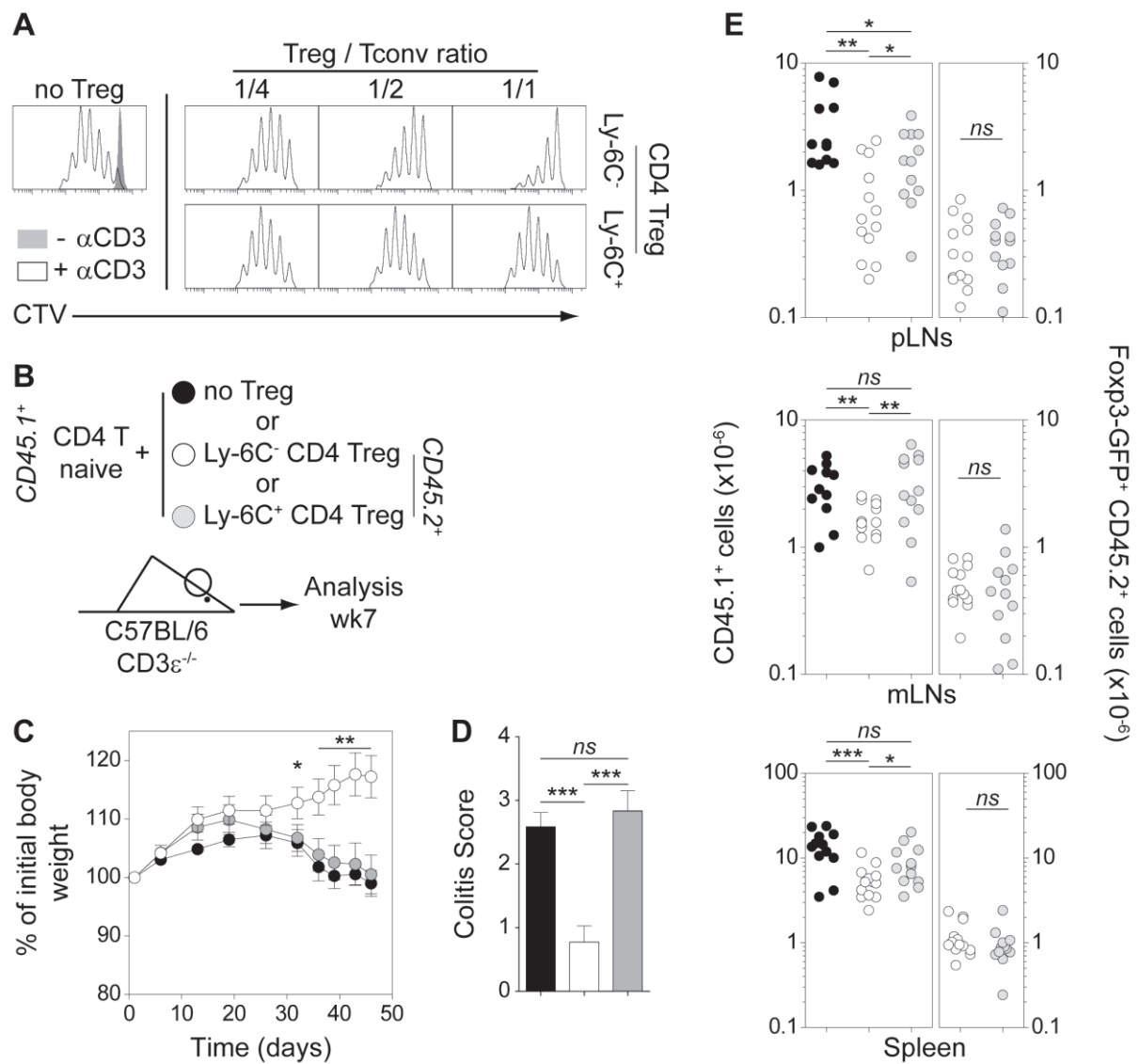
- Figure 2 -



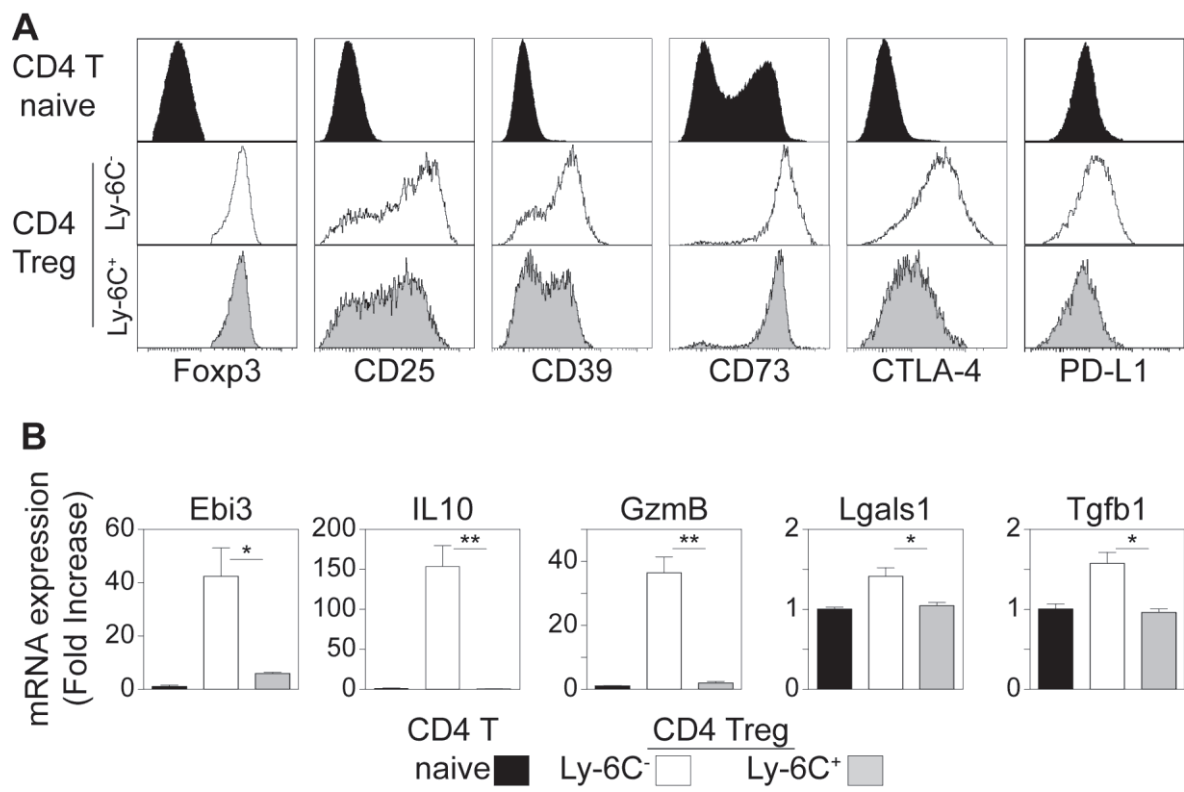
- Figure 3 -



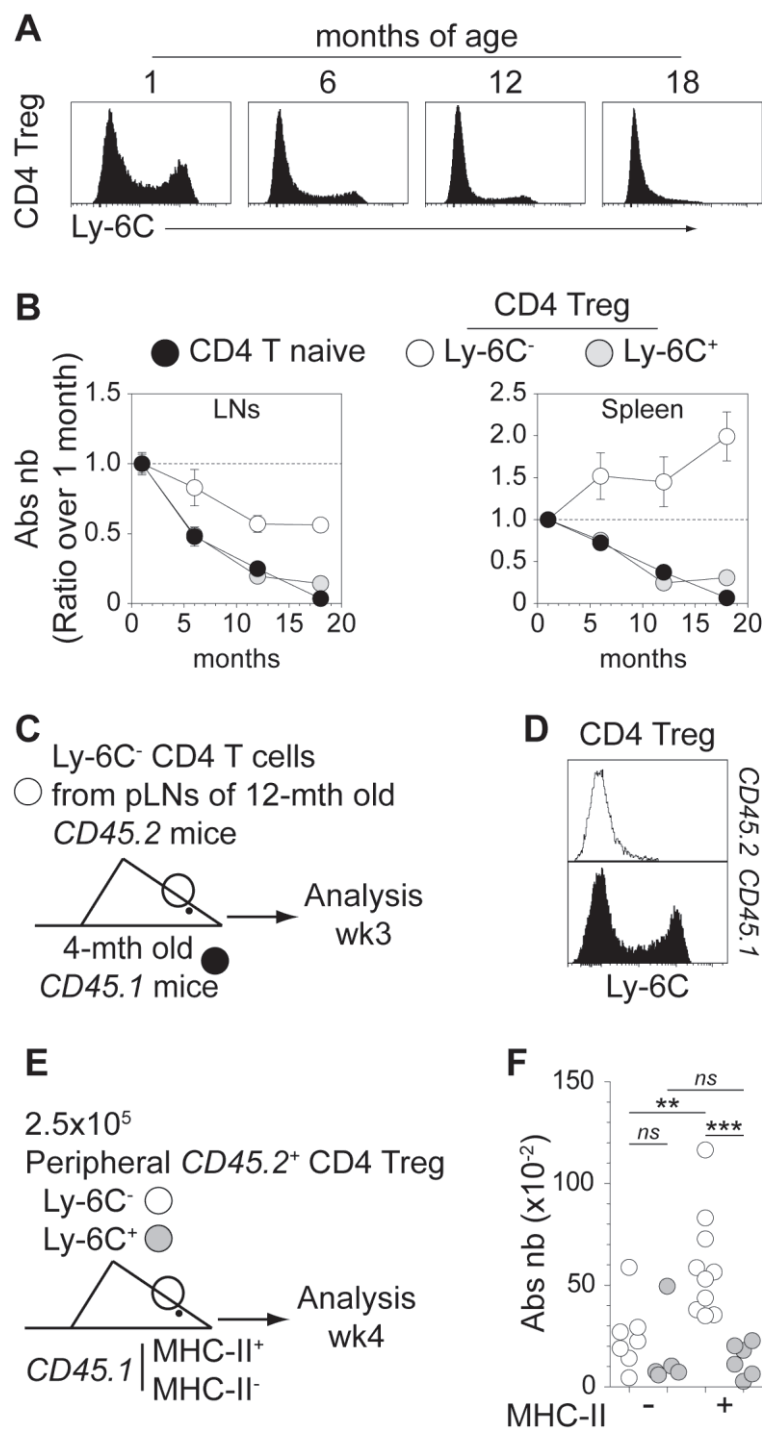
- Figure 4 -



- Figure 5 -

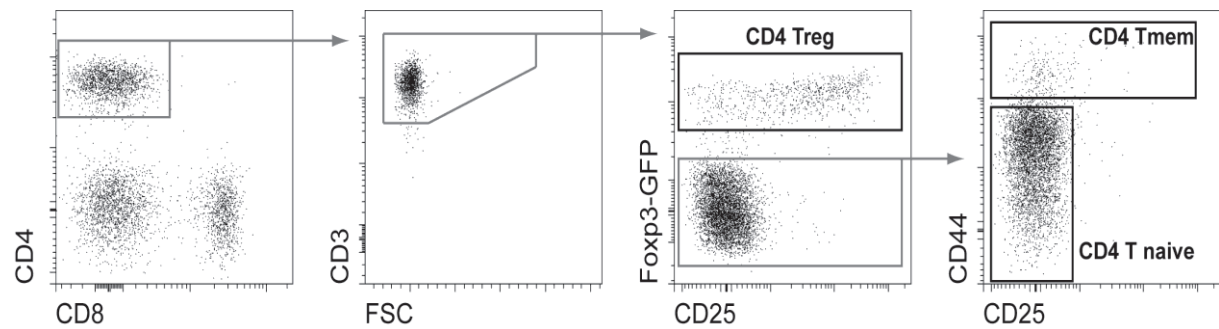


- Figure 6 -

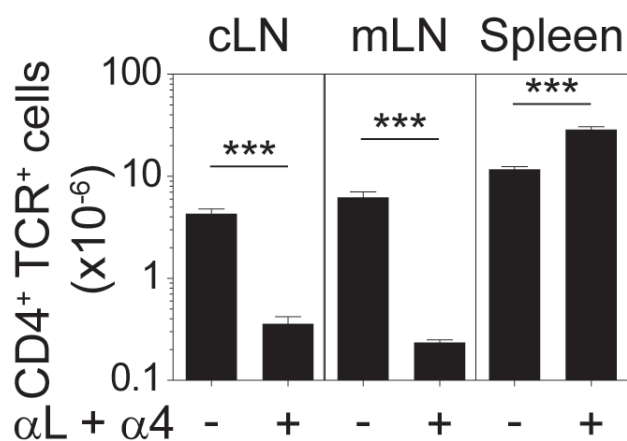


- Figure 7 -

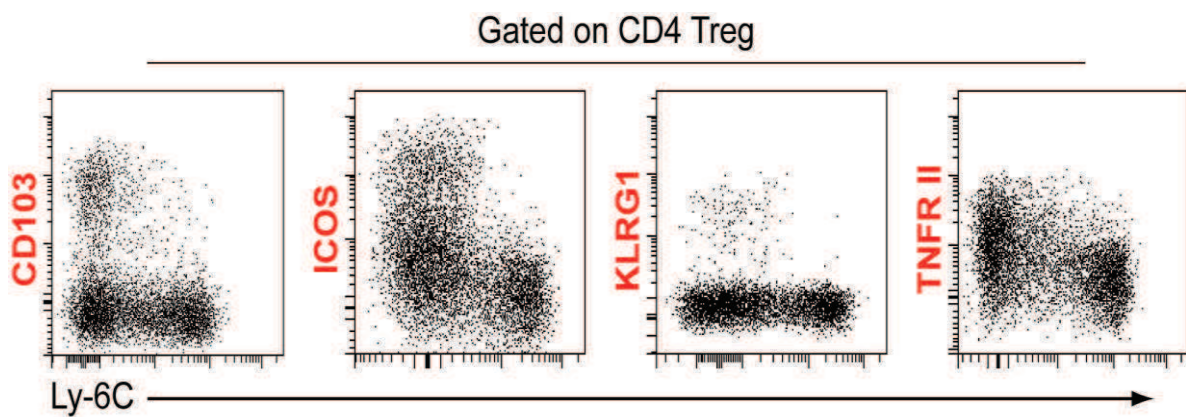
SUPPLEMENTARY FIGURES



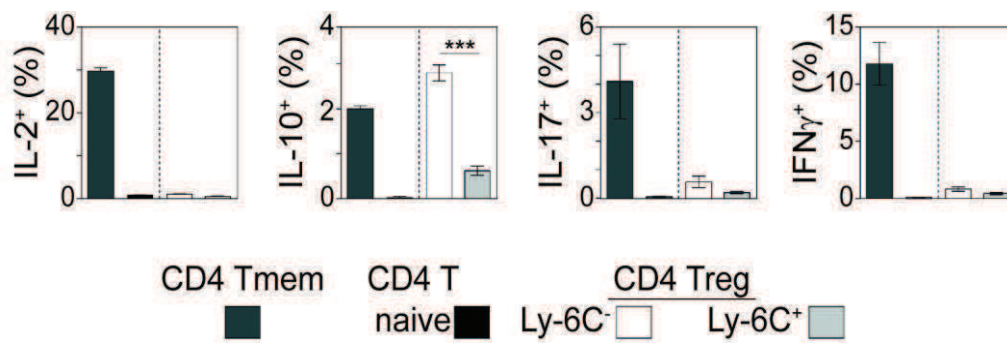
Supplementary Figure S1: Gating strategy used to discriminate peripheral CD4 T-cell subsets. Dot plots illustrating the gating strategy used to define peripheral naïve CD4 T cells (CD4 T naive) as Foxp3⁻ CD25⁻ CD44^{low} CD4⁺ CD8α⁻ TCRβ⁺ cells, regulatory CD4 T cells (CD4 Treg) as Foxp3⁺ CD4⁺ CD8α⁻ TCRβ⁺ cells and memory CD4 T cells (CD4 T mem) as Foxp3⁻ CD44^{hi} CD4⁺ CD8α⁻ TCRβ⁺ cells



Supplementary Figure S2: Rapid CD4 T cell exit from LNs after entry blockade. C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not i.p with 200μg of anti-αL and anti-α4 Abs. 24 hours later, cervical LNs (cLNs), mesenteric LNs (mLNs) and spleen were harvested and CD4 T cells were analyzed. Absolute numbers of CD4 T cells in cLNs, mLNs and spleen of treated or untreated mice were calculated. Results are shown as means ± SEM for 2 independent experiments.



Supplementary Figure S3: Phenotype of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells. Representative Ly-6C/CD103, Ly-6C/ICOS, Ly-6C/KLRG1 and Ly-6C/TNFR II dot-plots are shown for gated CD4 Treg cells recovered from the LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice.



Supplementary Figure S4: cytokine production by peripheral CD4 T-cell subsets. The proportions of IL-2, IL-10, IL-17, IFN- γ producing cells among memory, naive, Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 Treg cells recovered from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice were estimated after a pulse stimulation with phorbol myristate acetate and ionomycin. Results are shown as means \pm s.e.m. for six mice from two independent experiments.

DISCUSSION

I. Discussion des résultats

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à étudier le rôle des interactions avec le soi (complexe peptide du soi/CMH de classe II) dans la biologie des Tregs. Plus particulièrement, j'ai pu établir l'impact des signaux induits par le TCR dans l'homéostasie et la fonction des Tregs en périphérie. Nous avons ainsi pu démontrer, dans deux modèles différents et dans des souris non manipulées, que les Tregs doivent interagir avec le soi en périphérie afin de maintenir ou acquérir toutes leurs caractéristiques phénotypiques, fonctionnelles et transcriptionnelles.

A. L'autoréactivité est nécessaire aux fonctions suppressives des Treg

** En absence d'interactions avec le soi à la périphérie, les Tregs ne sont plus suppressifs.*

Les Tregs sont connus pour pouvoir supprimer l'activation et la prolifération des LTconvs *in vitro* et *in vivo*. Dans nos systèmes expérimentaux (Article 1), les CPAs d'origine hématopoïétique sont déficientes pour l'expression des molécules du CMH de classe II. Ainsi, nous privons les Tregs périphériques d'interactions avec les molécules du CMH de classe II. Nous observons que les Tregs privés d'interactions avec le soi à la périphérie sont bien moins efficaces pour inhiber l'augmentation de la taille, l'expression de CD25 et la prolifération des LTconvs *in vitro*. De plus, nous avons également observé qu'en absence d'interactions avec le soi, les Tregs n'étaient pas capables d'inhiber la prolifération, induite par la lymphopénie, des LTnaïfs *in vivo* (Article 1). Cependant, il est important de signaler que dans ces travaux les Tregs étaient alors purifiés sur la base de l'expression de CD25 et qu'une contamination en LTconvs activés pouvait expliquer ces résultats. Nous avons en partie écarté cette hypothèse en analysant le pourcentage de cellules Foxp3⁺ parmi la fraction CD25⁺ triée par billes magnétiques. En effet, plus de 87 % des cellules purifiées sont Foxp3⁺ (Article 1).

Nos résultats sur les Tregs peuvent être en partie comparés à ceux obtenus par d'autres équipes sur les cellules T CD4⁺ naïves. En effet, lorsque des LTnaïfs sont privés d'interactions avec les molécules de CMH de classe II, il a été observé une diminution de leur réactivité et de leur sensibilité à s'activer lors de la reconnaissance d'antigènes du non soi (Fischer et al., 2007; Hochweller et al., 2010; Stefanova et al., 2002). L'absence d'interactions avec le soi perturbent la fonctionnalité des LTnaïfs. La perte de fonctionnalité des Tregs observée en absence d'interaction avec le soi va dans le même sens.

** Les Tregs les plus autoréactifs sont les plus fonctionnels.*

Nos travaux montrent que les Tregs naturels qui sont majoritairement Ly-6C⁻ dans le thymus, sont capables de donner naissance à la périphérie aux Tregs Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ (Article 2). De plus, nous avons mis en évidence que des interactions continues avec le soi étaient nécessaires à la non-expression de Ly-6C (Martin et al., 2013). Nous avons alors émis l'hypothèse que les Tregs Ly-6C⁻ interagissaient plus fortement avec les molécules du CMH de classe II que les Tregs Ly-6C⁺. Dans le second article, nous montrons que les Tregs Ly-6C⁻ expriment plus fortement le marqueur CD5 que les Tregs Ly-6C⁺. Le niveau d'expression de CD5 est directement corrélé à l'affinité du TCR pour les complexes pCMH du soi (Azzam et al., 1998; Mandl et al., 2013). De plus, nous avons quantifié la phosphorylation de la chaîne du complexe CD3 dans les 2 types de Tregs, et, il en résulte que les Tregs Ly-6C⁻ présentent un plus fort taux de phosphorylation de la chaîne (Article 2). De façon cohérente avec nos résultats, il a été montré que l'injection d'un anticorps monoclonal bloquant les molécules du CMH de classe II entraîne une diminution de la phosphorylation de la chaîne du CD3 dans les LTconv (Stefanova et al., 2002) et les Tregs (Andersson et al., 2007). Ainsi, nos résultats suggèrent que les Tregs Ly-6C⁻ interagissent plus fortement ou plus souvent avec les molécules du CMH de classe II.

Nos résultats précédents (Article 1) montrent que des Tregs privés d'interaction avec le soi ne sont plus suppresseurs. Ainsi, il semblerait logique que les Tregs Ly-6C⁻ soient de meilleurs suppresseurs que leurs homologues Ly-6C⁺. Nous avons donc testé *in vitro* et *in vivo* les capacités suppressives de ces 2 sous-populations de Tregs. Le test de suppression *in vitro* montre clairement un défaut de régulation des Tregs Ly-6C⁺ car aucune inhibition de la prolifération des LTconv en réponse à l'anti-CD3 n'a pu être observée. De plus, nous montrons clairement que les Tregs Ly-6C⁺ ne sont pas capables de prévenir l'apparition de la maladie inflammatoire de l'intestin. En effet, nous observons une forte inflammation de l'intestin et une perte de poids similaire aux souris injectées avec uniquement des LTnaïfs (Article 2).

**Les fortes interactions avec le soi modifient le comportement des Tregs in vivo.*

Les LTnaïfs circulent en permanence dans les différents ganglions lymphatiques. Il a été démontré que l'entrée dans les ganglions était dépendante des intégrines LFA-1 et VLA-4 (von Andrian and Mempel, 2003). Nous avons montré que si on bloquait ces molécules, on enrichissait les ganglions en Tregs et ces Tregs résiduels sont exclusivement Ly-6C⁻ (Article

2). De plus, nous avons démontré au sein de l'équipe que les LTnaïfs les plus retenus dans les ganglions étaient les plus autoréactifs (Martin et al., 2013). Ils semblent donc que les Tregs les plus affins pour le soi interagissent fortement avec les DCs. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus par l'équipe de Sakaguchi montrant que les Tregs forment des agrégats et interagissent plus longtemps avec les DCs que les LTconvs (Onishi et al., 2008). Nos résultats suggèrent que les Tregs interagissent plus fortement et plus longtemps avec les DCs à cause de leur forte affinité pour le soi. Ces fortes interactions peuvent générer de forts signaux du TCR et induire l'activation des Tregs.

B. L'impact de la reconnaissance du soi sur l'activation des Tregs.

** Au niveau moléculaire ?*

Contrairement aux LTnaïfs, d'un point de vue moléculaire, les signaux du TCR reçus par les Tregs périphériques grâce aux interactions avec le soi semblent entraîner leur activation. Des études ont montré que des Tregs, déficients pour une protéine impliquée dans la signalisation du TCR, avaient des capacités suppressives diminuées *in vitro* (Fu et al., 2010; Kim et al., 2009; Patton et al., 2006; Tanaka et al., 2010; Wang et al., 2008). Cependant, il est difficile de savoir dans ces études si l'effet est dû à une absence de signaux du TCR *in vivo* ou à une absence de réponse à l'anti-CD3 *in vitro*. Les résultats de notre première étude suggèrent fortement qu'un défaut de signalisation du TCR *in vivo* engendre déjà une perte de fonction des Tregs (Article 1). Notre seconde étude appuie également cette hypothèse. En effet, les signaux du TCR lors de l'activation induisent la translocation dans le noyau ou l'exclusion de ce dernier de certains facteurs de transcription. Or, nous démontrons, que dans les Tregs Ly-6C⁻, il y a une plus forte proportion du facteur de transcription Foxo1 dans le cytoplasme et une plus forte proportion de NFAT2 dans le noyau (Article 2). Ces résultats sont en accord avec des données récentes montrant qu'une forte stimulation du TCR entraîne l'exclusion nucléaire de Foxo1 dans les Tregs (Ouyang et al., 2012) et la translocation dans le noyau de NFAT2 (Zanin-Zhorov et al., 2012). La localisation subcellulaire d'autres facteurs de transcription impliqués en aval du TCR doit être également différente dans ces 2 types de Tregs.

** D'un point de vue phénotypique ?*

Nous démontrons que, lorsque nous privons les Tregs périphériques d'interactions avec le soi, ils présentent un phénotype altéré (Article 1). Parmi les marqueurs d'activation, CD44 est moins exprimé par les Tregs privés d'interactions avec le soi par rapport aux Tregs WT. D'autres marqueurs d'activation sont plus fortement exprimés par les Tregs privés d'interactions avec le soi ou exprimés de façon équivalente par rapport au Tregs WT (CD103, CD25). Ces Tregs ne présentent donc pas particulièrement un phénotype de cellules moins activé que les Tregs pouvant interagir avec le soi ou les Treg WT, contrairement aux Tregs Ly-6C⁺ de souris non manipulées par rapport aux Tregs Ly-6C⁻. Il est possible d'expliquer cette contradiction apparente par le fait que dans ce modèle de transfert adoptif, nous injectons des LTs CD4⁺ et CD8⁺ dans des hôtes présentant une lymphopénie profonde. L'injection de LTs dans un environnement lymphopénique pourrait entraîner, comme décrit dans des travaux antérieurs de l'équipe (Martin et al., 2006; Martin et al., 2003), une activation des cellules transférées. Nous avons essayé de minimiser la LIP et par conséquent l'activation des LTs en injectant un grand nombre de LTs (100x10⁶ cellules / souris) pour remplir le compartiment. Malheureusement, nous ne pouvons pas empêcher la prolifération spontanée des Tregs injectés dans les hôtes déficients pour les molécules du CMH de classe II. La prolifération spontanée des Tregs est très dépendante de l'IL-2 (Le Champion et al., 2012) et de l'IL-7 (Simonetta et al., 2012). Or, dans notre modèle nous injectons également des LTs CD8⁺ qui suite au transfert produisent beaucoup d'IL-2 (Article 1). Ainsi, une LIP des Tregs pourrait expliquer le phénotype d'activation partiel des Tregs privés d'interactions avec le soi. De plus, le temps passé dans les receveurs n'étant que de 5 jours, il est possible que l'altération des marqueurs que nous observons soit dépendante de la demi-vie plus ou moins longue de ces marqueurs.

Dans les souris non manipulées, nous montrons que les Tregs Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ présentent un phénotype différent. En effet, comme indiqué plus haut, les Tregs Ly-6C⁺ sont moins activés que les Tregs Ly-6C⁻. De plus, une proportion plus importante des Tregs Ly-6C⁻ exprime Ki-67, marqueur exprimé par les cellules en cycle (Article 2). Ainsi, nous montrons que les signaux du TCR reçus par les Tregs périphériques induisent leur activation et leur prolifération homéostatique. Ceci est en accord des travaux de l'équipe de Benoît Salomon (Fisson et al., 2003). En effet, dans cette étude, ils démontrent qu'une sous-population de Tregs présente un phénotype activé similaire à celui des Tregs Ly-6C⁻ et prolifère en réponse au soi.

Nos résultats suggèrent que la forte autoréactivité des Tregs maintient une activation nécessaire à leurs fonctions suppressives. Il serait donc intéressant de regarder les mécanismes moléculaires, liés aux fonctions suppressives des Tregs, qui sont altérés en absence d'interactions avec le soi.

C. Autour de Foxp3.

Depuis sa découverte (Hori et al., 2003), le facteur de transcription Foxp3 est considéré comme un marqueur spécifique des Tregs et comme suffisant pour induire les fonctions suppressives de ces derniers (Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003). En effet, une diminution d'expression de Foxp3 dans les Tregs périphériques conduit à une perte des fonctions suppressives et à leur conversion en LTs effecteurs qui contribuent à l'émergence de maladies auto-immunes (Komatsu et al., 2009; Wan and Flavell, 2007; Zhou et al., 2009).

Nos travaux montrent que lorsque l'on prive les Tregs d'interactions avec le soi, les Tregs perdent leurs fonctions suppressives (Article 1) bien que l'expression de Foxp3 ne soit pas affectée ni au niveau transcriptionnel (données non montrées) ni au niveau protéique (Article 1). Dans des souris non manipulées, nous avons également montré que les Tregs Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺ expriment de façon équivalente la protéine Foxp3 malgré leurs différences fonctionnelles (Article 2). Nos résultats sont donc en contradiction apparente avec ceux suggérant que l'expression de Foxp3 suffit à conférer aux LTs des capacités suppressives.

Chez l'homme, il a été montré depuis longtemps que les LTconvs expriment Foxp3 lors de leur activation (Wang 2007 EJI). Plus récemment, il a été montré que Foxp3 était localisé dans le cytoplasme plutôt que dans le noyau de ces LTconvs et que par conséquent il ne conférait pas de fonctions régulatrices à ces cellules (Magg et al., 2012). Une exclusion nucléaire de Foxp3 dans les Tregs Ly-6C⁺ pourrait expliquer leur manque de fonctions suppressives. Mais, nos données d'imagerie contredisent une telle hypothèse puisque dans les Tregs Ly-6C⁺ comme dans les Tregs Ly-6C⁻, la localisation de Foxp3 est quasi-totalement nucléaire (Article 2).

Même si l'expression et la localisation de Foxp3 ne sont pas modifiées, il est possible que la fonctionnalité de Foxp3 soit altérée en absence d'interactions avec le soi. En effet, plusieurs études ont révélé que Foxp3 doit être acétylé et phosphorylé pour être fonctionnel (Nie et al., 2013; Tao et al., 2007; Xiao et al., 2010). Il se pourrait donc que les signaux en aval du TCR induisent des modifications post-traductionnelles de Foxp3, régulant ainsi sa fonction.

Néanmoins, nous avons comparé le profil transcriptionnel de Tregs privés ou pas d'interactions avec le soi (Article 1) et nous avons observé seulement 9 gènes exprimés différemment dont la transcription est corrélée à l'activité de Foxp3 (Article 1).

L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que l'absence d'interactions avec le soi ne perturberait pas l'expression de Foxp3, sa localisation et la fonctionnalité de celui-ci. Ainsi, on peut se demander dans quelle mesure les signaux du TCR, initiés par les interactions avec le soi, permettent le maintien des fonctions suppressives des Tregs.

D. Les interactions avec le soi permettent l'expression de molécules suppressives.

Les signaux du TCR induisent de nombreuses modifications phénotypiques et fonctionnelles lors de l'activation des LTconv (expression de CD69 et CD44, production de cytokines effectrices : IFN- γ , TNF- α , IL-2 etc...). Lors de ma thèse, j'ai étudié l'expression des molécules effectrices impliquées dans les fonctions suppressives des Tregs afin d'observer si les interactions avec le soi sont nécessaires à leur expression.

** Perturbation phénotypique des Tregs en absence d'interactions avec le soi.*

Les Tregs privés ou pas d'interactions avec le soi présentent des similitudes phénotypiques mais aussi des différences (Article 1). Seules les différences communes aux 2 modèles ont été prises en compte car certaines différences observées peuvent être dues aux modèles expérimentaux en eux-mêmes. L'expression des molécules CD25, CD73 et PD-L1 est modifiée dans les 2 modèles (Article 1). Cependant, seule la molécule CD73 est diminuée dans les Tregs privés d'interactions avec le soi par rapport à des Tregs WT. CD25 et PD-L1, quant à eux, sont augmentés dans les Tregs privés d'interactions avec le soi. Ces résultats inverses de ceux escomptés ne peuvent donc pas expliquer la perte de fonction de ces Tregs. L'ectoenzyme CD73 pourrait donc expliquer la perte de fonction mais la diminution observée reste faible. Nous ne pouvons pas exclure que d'autres molécules non étudiées puissent expliquer la perte de fonction des Tregs privés d'interactions avec le soi

De manière plus intéressante, nous montrons que dans les Tregs Ly-6C⁺, il y a une plus faible expression d'un grand nombre de protéines immunosuppressives (Article 2). Entre autres, nous retrouvons une diminution de l'expression de CD73 à la surface des Tregs Ly-6C⁺ par rapport aux Tregs Ly-6C⁻. La différence d'expression la plus forte entre les Tregs Ly-6C⁺ et Ly-6C⁻ correspond à celle observée pour la molécule CTLA-4. Il a été démontré que

l'expression de cette molécule était induite en partie par le facteur de transcription NFAT (Li et al., 2012). La moindre expression de CTLA-4 dans les Tregs Ly-6C⁺ est en accord avec le fait que NFAT est moins présent dans le noyau des Tregs Ly-6C⁺ (Article 2). L'équipe d'Alfred Singer a démontré récemment que les LTconvs stockent la protéine CTLA-4 de façon différente de celle des Tregs. En effet, dans les Tregs, les protéines CTLA-4 sont stockées dans des vésicules sous-membranaires qui sont recyclées très rapidement alors que dans les LTconvs les protéines sont retenues dans le golgi. De plus, ils démontrent que le signal TCR, lors de l'activation, permettait l'externalisation de la protéine dans les LTconvs, leurs conférant ainsi un pouvoir suppresseur (Tai et al., 2012). Ainsi, il serait possible que la protéine CTLA-4 soit localisée dans le golgi des Ly-6C⁺ comme pour les LTconvs. Nous avons testé cette hypothèse, mais, nous n'avons pas observé de différence de localisation entre les Tregs Ly-6C⁻ et Ly-6C⁺. Pour les 2 types de Tregs, les protéines CTLA-4 étaient localisées dans les vésicules sous-membranaires (données non montrées).

L'ensemble de nos résultats suggère fortement que les signaux du TCR reçus par les Tregs permettraient le maintien de l'expression de protéines impliquées dans leurs fonctions suppressives.

** Qu'en est-il des cytokines immuno-suppressives ?*

Comme je l'ai présenté dans mon introduction (cf. paragraphe cytokines), les Tregs expriment un véritable arsenal de molécules suppressives. Afin de comprendre le(s) mécanisme(s) défaillant(s) dans la fonctionnalité des Tregs n'interagissant pas ou faiblement avec le soi, nous avons étudié leur profil cytokinique.

Tout d'abord, nous avons observé un pourcentage plus faible de Tregs producteurs d'IL-10 5 jours après transfert dans les receveurs n'exprimant pas les molécules de classe II du CMH (Article 1). De façon concordante, le gène *Il10* est moins transcrit dans ces Tregs (Article 1). De plus, des résultats similaires ont pu être observés dans les Tregs Ly-6C⁺. En effet, le gène de l'IL-10 est très faiblement exprimé dans les Tregs Ly-6C⁺ (Article 2) et nous retrouvons également un plus faible nombre de Tregs producteurs d'IL-10 parmi les Tregs Ly-6C⁺ par comparaison aux Tregs Ly-6C⁻. Cependant, il convient de préciser que l'IL-10, bien qu'essentielle pour la régulation au niveau des muqueuses (Asseman et al., 1999; Rubtsov et al., 2010), n'est pas impliquée dans la régulation *in vitro* de la prolifération des LTconvs (Shevach, 2006; Thornton and Shevach, 1998). D'autres cytokines anti-inflammatoires

impliquées dans les mécanismes de régulation ont été testées en RT-qPCR dans nos 2 études. L'expression des gènes codant pour la galectine-1, l'IL-35, le TGF- β et le granzyme B s'est révélée non altérée dans les Tregs après 5 jours dans des receveurs n'exprimant pas les molécules du CMH de classe II (Article 1). Par contre, de manière intéressante, nous montrons que ces gènes sont moins exprimés dans les Tregs Ly-6C⁺ par rapport aux Tregs Ly-6C⁻ (Article 2) et l'ensemble de ces médiateurs solubles, mis à part l'IL-10, joue un rôle dans la régulation *in vitro* (Collison et al., 2007; Gondek et al., 2005; Nakamura et al., 2001; Tang and Bluestone, 2008).

L'ensemble de nos résultats ne révèle que peu de candidats qui pourraient expliquer la perte des capacités suppressives des Tregs par défaut d'interaction avec le soi (Article 1). L'IL-10 et CD73 sont les seules molécules immunosuppressives analysées qui sont diminuées. Tandis que dans les Tregs Ly-6C⁺, c'est toute la machinerie de régulation qui est perturbée. Ces données suggèrent que, dans notre système expérimental, l'injection de cellules dans des hôtes lymphopéniques pourrait biaiser l'interprétation des résultats obtenus. Il est possible que par exemple le fait d'analyser les cellules seulement 5 jours après leur transfert soit trop court pour modifier l'expression de certains gènes. L'expression des molécules suppressives a aussi été analysée dans le système de chimère, et l'expression de l'IL-10 et de CD73 sont également diminuées (données non montrées). Or, dans le système des chimères nous avons analysé les Tregs 28 jours après la greffe de moelle osseuse. À ce stade du transfert, les compartiments de LTs CD4⁺ et CD8⁺ sont restaurés, mais des signes inflammatoires (lymphadénopathie) sont déjà détectables dans les chimères dont les cellules hématopoïétiques n'expriment pas les molécules du CMH de classe II (Poitrasson-Riviere et al., 2008). Il est probable que la LIP dans le modèle de transfert et l'inflammation dans le modèle de chimère pourraient contribuer à modifier l'expression de certaines molécules de suppressions par les Tregs. Mais, dans une souris non manipulée, nous montrons que des Tregs de moins forte affinité pour le soi ont un phénotype et un profil cytokinique différent. Il est intéressant de constater que malgré l'expression de beaucoup de molécules de suppression, les Tregs privés complètement d'interactions avec le soi ne peuvent pas inhiber la pathologie développée par les chimères (Poitrasson-Riviere et al., 2008) et ne peuvent pas inhiber la prolifération des LTconv^s *in vitro*. Ainsi, outre, l'expression des molécules suppressives, les interactions avec le soi induisent d'autres fonctions dans les Tregs

** Les fonctions effectrices induites par les interactions avec le soi*

Ces dernières années, un concept a émergé concernant les fonctions effectrices des Tregs. Les Tregs doivent exprimer les mêmes facteurs de transcriptions que les LTs effecteurs qu'ils inhibent (Cretney et al., 2013). Certaines protéines et certains facteurs de transcription semblent même indispensables pour l'ensemble de ces fonctions effectrices. Dans le second article, nous montrons que des interactions avec le soi sont nécessaires à l'expression de ces protéines. En effet, les Tregs Ly-6C⁻ expriment plus fortement les gènes *Tbx21*, *Rorc*, *Rora*, *Bcl6*, *Irf4* et surtout *Prdm1* que les Tregs Ly-6C⁺ (Article 2). De manière intéressante, le gène *Prdm1* code pour la protéine Blimp-1 qui est un facteur de transcription important pour l'expression de l'IL-10 et la différenciation en Tregs effecteurs (Cretney et al., 2011). Nous observons également une proportion plus forte de cellules CXCR3⁺ parmi les Tregs Ly-6C⁻ (Article 2). CXCR3 est le récepteur des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11. Il permet la migration des LTs Th1 vers les sites inflammatoires et aide à la maturation des Th1. Il a été montré que CXCR3 était induit par le facteur de transcription T-bet dans les Tregs (Koch et al., 2009).

Le gène *Irf4* est exprimé préférentiellement dans les Tregs Ly-6C⁻. IRF4, en plus d'être important dans la différenciation Th2, permet aux Tregs d'exprimer certaines protéines impliquées dans leurs fonctions effectrices comme CD103, ICOS et CTLA-4 (Ohkura and Sakaguchi, 2011). Or, nous démontrons que ces protéines sont préférentiellement ou exclusivement exprimées par les Tregs Ly-6C⁻ (Article 2). Enfin, il a été récemment démontré qu'une sous-population de Tregs effecteurs était localisée dans les centres germinatifs (Linterman et al., 2011). Ces Tregs expriment Bcl6, Blimp-1 et sont ICOS^{fort}, ainsi que PD-1⁺. Ils jouent un rôle important dans la régulation des réponses dans les centres germinatifs. Nos résultats suggèrent que la population des Tregs Ly-6C⁻ contient cette sous-population de Tregs effecteurs car comme nous le montrons, ils expriment l'ensemble de ces molécules ainsi que PD-1 (données non montrées).

Nos résultats suggèrent fortement que la reconnaissance du soi mène à l'expression des molécules impliquées dans les fonctions suppressives et effectrices des Tregs.

E. Une signature transcriptionnelle unique du soi

En plus, d'apporter les signaux du TCR nécessaires aux fonctions des Tregs, les interactions avec le soi génèrent une signature transcriptionnelle unique. En effet, nous avons réalisé des puces à ADN afin de dégager des candidats potentiels pouvant expliquer la perte des fonctions suppressives des Tregs privés d'interactions avec le soi. Ces puces ont été réalisées dans les modèles expérimentaux utilisés dans l'article 1. Tout d'abord, nous avons pu montrer que les résultats obtenus dans nos 2 systèmes étaient très comparables. L'équipe de Diane Mathis et Christophe Benoist ont réalisé en 2007 une série de puces à ADN qui leur a permis de dégager une signature transcriptionnelle des Tregs et de séparer les gènes dépendant ou non de Foxp3 (Hill et al., 2007).

Nous avons ainsi pu définir que l'absence d'interactions avec le soi modifiait de façon significative l'expression de 547 gènes dans les Tregs après transfert adoptif dans des receveurs exprimant ou pas les molécules de classe II du CMH. De manière intéressante, seulement 50 gènes parmi ces 547 appartiennent à la signature Tregs définie par Hill et ses collègues. Parmi ces 50 gènes, certains avaient déjà été décrits comme impliqués dans les fonctions suppressives des Tregs. La répression de l'expression du gène *Pde3b* a été définie par l'équipe de Rudensky comme essentielle aux fonctions suppressives des Tregs (Gavin et al., 2007). En effet, ce gène code pour la phosphodiesterase 3B qui dégrade l'AMPc. Les Tregs contiennent un fort taux d'AMPc qu'ils peuvent transmettre aux LTconvS afin d'inhiber leur production d'IL-2 et leur prolifération (Bopp et al., 2007; Bopp et al., 2009). Nous montrons que ce gène est moins réprimé dans les Tregs privés d'interactions avec le soi. Nous retrouvons également que l'expression des gènes *Itgae* (codant pour la protéine CD103), *Irf4* et *Rora* est diminuée. Enfin, nous observons une diminution de la transcription du gène *cd38* qui est aussi impliqué dans les fonctions suppressives des Tregs (Hubert et al., 2010; Patton et al., 2011).

Nous avons également vérifié les résultats des puces par RT-qPCR (Article 1). Nous avons également testé l'expression de ces gènes dans les Tregs Ly-6C⁺ et Ly-6C⁻. De manière très intéressante, nous avons pu observer que les Tregs Ly-6C⁺ présentaient la même signature transcriptionnelle que les Tregs privés d'interactions avec le soi (données non montrées). Ces résultats renforcent notre première étude et confirment que nous avons pu définir une signature transcriptionnelle dépendante de l'interaction des cellules avec le soi.

D'autres gènes, n'appartenant pas à la signature Tregs définis par Hill et ses collègues, se sont révélés également différentiellement exprimés entre des Tregs pouvant interagir ou pas avec le soi. Ainsi, nous avons remarqué que l'expression du gène *Bach2* était diminuée dans les Tregs privés d'interactions avec le soi et dans les Tregs Ly-6C⁺ (données non montrées). Or, ce gène a été récemment mis en cause dans la génération des Tregs et dans la stabilisation de leur programme effecteur (Roychoudhuri et al., 2013). Des interactions continuent avec le soi semblent mettre en place un programme génétique permettant la stabilisation des fonctions suppressives des Tregs.

F. Les interactions avec le soi stabilisent le pool de Tregs périphériques.

** Le nombre de Tregs peu autoréactifs (Ly-6C⁺) diminue au cours du temps.*

Nous avons observé que les Tregs Ly-6C⁺, qui représentent environ 30 % des Tregs des organes lymphoïdes secondaires d'une souris jeune adulte, sont quasiment absents de la périphérie d'une souris âgée (Article 2) Les données obtenues montrent que seuls les Tregs Ly-6C⁺ diminuent en nombre dans les organes lymphoïdes secondaires. Il semble donc que seuls les Tregs les plus autoréactifs puissent se maintenir au cours du temps.

** Disparition ou conversion ?*

Il est possible que l'environnement peptidique change au cours d'une vie et que les antigènes du soi présentés par les molécules du CMH de classe II dans une souris jeune adulte diffèrent des antigènes d'une souris âgée. Nous avons observé que le transfert de Tregs Ly-6C⁻ venant d'une souris âgée dans une souris jeune n'induisait pas l'expression de Ly-6C sur les Tregs transférés (Article 2). Ces résultats suggèrent que l'environnement peptidique n'influe pas sur l'expression de Ly-6C avec l'âge. Ainsi, les Tregs Ly-6C⁻ ne se convertissent pas en Tregs Ly-6C⁺.

Il a été montré que la survie des LTs CD4 dépendait, entre autres, des interactions avec les molécules du CMH de classe II du soi (Martin et al., 2006). Nous montrons également que lorsque l'on transfère des Tregs Ly-6C⁺ un très faible nombre de cellules est récupéré un mois après transfert ceci de façon indépendante de l'expression des molécules de classe II du CMH par l'hôte (Article 2). Ces derniers résultats suggère une mort programmée des Tregs Ly-6C⁺ quelque soit leur environnement. Enfin, lorsque nous transférons des Tregs Ly-6C⁻ dans un hôte n'exprimant pas les molécules de classe II du CMH, nous récupérons un nombre limité

de Tregs équivalent à ceux observé lors des transferts de Tregs Ly-6C⁺ (Article 2), tandis que nous récupérons un nombre significativement plus élevé de Tregs Ly-6C⁻ après leur transfert dans un hôte exprimant les molécules de classe II du CMH. Ainsi, ces résultats suggèrent que les interactions avec le soi jouent un rôle important dans la survie des Tregs Ly-6C⁻.

D'autres arguments vont dans ce sens. Ils ne sont pas présentés dans l'article et sont en faveur d'une mort préférentielle des Tregs Ly-6C⁺. En effet, nous avons observé que les Tregs Ly-6C⁺ exprimaient plus faiblement le CD25 (Article 2) et le CD122 (données non montrées). Cela pourrait indiquer que les Tregs Ly-6C⁺ seraient moins sensibles à l'IL-2 qui, comme nous l'avons vu, est une cytokine cruciale à la survie des Tregs. De plus, les Tregs Ly-6C⁺ expriment moins fortement la protéine FolR4 qui joue également un rôle dans l'homéostasie des Tregs (Kinoshita et al., 2012; Yamaguchi et al., 2007). Enfin, nous avons observé qu'il y avait une plus forte proportion de Tregs Ly-6C⁺ qui expriment la caspase3 activée dans la rate et les ganglions d'une souris âgée.

L'ensemble de ces résultats sont en faveur d'une disparition des Tregs les moins autoréactifs au cours du temps. Ainsi, les interactions avec le soi semblent indispensables au maintien du pool de Tregs en périphérie.

II. Points de vue et Perspectives

J'ai discuté les résultats de mes 2 articles en les comparants dans la première partie de la discussion. Je vais maintenant discuter différents points de vue et perspectives.

** Ly-6C et la reconnaissance du soi.*

Dans nos études, nous définissons la reconnaissance du soi comme la reconnaissance des molécules du CMH de classe II en association avec des peptides du soi. Nous possédons un grand nombre de bactéries commensales au sein de notre organisme. Doit-on alors définir les peptides du soi comme étant l'ensemble de ces peptides d'origine bactérienne et cellulaire ou alors comme provenant uniquement des protéines cellulaires ? En bref, quelles sont les limites du « soi » ?

Dans notre second article, nous identifions les Tregs Ly-6C⁻ comme étant les cellules reconnaissant le plus fortement le soi. Mais, nous pouvons nous demander l'influence de la présence de la flore commensale sur l'expression de Ly-6C. Nous démontrons que dans les souris sans germe la proportion de Tregs Ly-6C⁻ dans les organes lymphoïdes secondaires est

similaire à celle observée dans des souris C57BL/6 non axénique (Article 2). La présence ou l'absence de bactéries commensales ne perturbe donc pas l'expression de Ly-6C dans les organes lymphoïdes secondaires. Cependant, il serait pertinent de regarder la proportion de Tregs Ly-6C⁻ dans les tissus exposés à l'environnement (peau, intestin, poumon etc...), en fonction de la présence ou de l'absence d'une flore commensale.

Nous avons constaté que la proportion de Tregs Ly-6C⁺ varie selon l'organe observé (Article 2). La composition cellulaire des différents organes pourrait donc influencer sur l'expression de Ly-6C. En particulier, les différentes CPAs présentes dans ces organes n'ont pas la même capacité à présenter des peptides du soi. Dans la rate, nous observons que le pourcentage de Tregs Ly-6C⁺ est plus faible que dans les autres organes lymphoïdes secondaires. La rate est composée majoritairement (à près de 60 %) de LBs et contient un plus grand nombre de DCs que les ganglions lymphatiques. Les DCs, à l'état physiologique, présentent de façon permanente des antigènes issus de leur environnement. Elles contribuent de façon importante à l'induction et au maintien de la tolérance au soi et participent à la prévention de l'auto-immunité (Steinman et al., 2003). Les LBs peuvent également présenter efficacement les antigènes aux LTs (Lanzavecchia, 1990) et induire une tolérance (Tsitoura et al., 2002).

Il a été démontré que ces deux populations, les LBs (Ray et al., 2012) et les DCs (Darrasse-Jeze et al., 2009) participaient à l'homéostasie des Tregs. Ainsi, il serait intéressant de dépléter les LBs ou les DCs afin d'observer l'évolution de l'expression de Ly-6C par les Tregs et peut-être ainsi déterminer le type de CPAs nécessaires à la perte d'expression de Ly-6C.

** Les Tregs Ly-6C⁺*

Nous démontrons que seuls les Tregs Ly-6C⁻ sont supprimeurs et qu'ils sont les seuls à se maintenir dans le temps (Article 2). Les Tregs Ly-6C⁺ représentent néanmoins environ 30 % des Tregs des organes lymphoïdes secondaires d'une souris jeune adulte (Article 2). Quel est l'intérêt pour l'organisme de générer de tels Tregs non fonctionnels ? Comment expliquer que les Tregs Ly-6C⁺ qui sont sélectionnés pour leur capacité d'interactions fortes avec les complexes pCMH du soi dans le thymus, ne soient pas capables d'interagir fortement avec le soi en périphérie ?

Lors de la génération des Tregs, il a été proposé qu'il y ait un chevauchement d'à peu près 20 % du répertoire TCR des Tregs avec celui des LTconvs (Hsieh et al., 2006). D'autres

études ont, quant à elles, suggéré un chevauchement beaucoup plus important (Pacholczyk et al., 2007). Une première hypothèse, quant à la génération des Tregs Ly-6C⁺, serait que ces cellules correspondent aux précurseurs thymiques les moins affins pour le soi s'engageant dans la voie de différenciation des Tregs, c'est à dire les 20% de cellules dont le répertoire est très proche de celui des LTconvs (hypothèse 1). Il se pourrait également que le répertoire antigénique qui permet la sélection des Tregs dans le thymus soit différent du répertoire antigénique retrouvé en périphérie (hypothèse 2). Ainsi, les Tregs Ly-6C⁺ correspondraient aux Tregs ne retrouvant pas à la périphérie les complexes pCMH du soi qui ont permis leur génération dans le thymus. Il serait donc intéressant de comparer les répertoires TCR des Tregs Ly-6C⁻, des Tregs Ly-6C⁺ et des LTnaïfs. En effet, si la première hypothèse s'avère être la bonne, on peut s'attendre à ce que le répertoire TCR des Tregs Ly-6C⁺ soit bien plus proche de celui des LTnaïfs que de celui des Tregs Ly-6C⁻. Si la seconde hypothèse correspond à la réalité, le répertoire TCR des Tregs Ly-6C⁺, bien que différent de celui des Tregs Ly-6C⁻ (pas les mêmes antigènes), ne serait pas plus proche de celui des LTnaïfs que ne le serait celui des Tregs Ly-6C⁻ avec celui des LTnaïfs.

Une caractérisation plus approfondie des Tregs Ly-6C⁺ permettra peut-être de déterminer quel est le rôle de ces cellules et mieux comprendre les processus de sélections thymiques et périphériques des Tregs.

ANNEXES

Article 3 :

IL-2 and IL-7 determine the homeostatic balance between the regulatory and conventional CD4⁺ T-cell compartments during peripheral T-cell reconstitution.

J Immunol 2012 Oct 1;189(7):3339-46

Armelle Le Campion*, Arnaud Pommier*, Arnaud Delpoux, Laurence Stouvenel, Cédric Auffray, Bruno Martin*, Bruno Lucas*.

Durant les dernières décennies, les facteurs influençant la survie et l'homéostasie des lymphocytes T conventionnels ont été identifiés. L'IL-7 et le signal TCR permettent la survie des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs chez des souris reconstituées et leur prolifération dans un environnement lymphopénique, alors que la survie et la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires reposent sur une combinaison entre l'IL-7 et l'IL-15. En revanche, les facteurs régissant la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs induite par la lymphopénie sont beaucoup moins connus. Nous avons évalué ici l'impact des facteurs « classiques » influençant la prolifération tel que l'IL-2, l'IL-7 et le signal TCR. L'ensemble de nos résultats suggère qu'alors que la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels est étroitement liée au taux d'IL-7, la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs repose sur l'IL-2. La capacité de l'IL-7 à provoquer la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels avec une expansion concomitante minime de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs ouvre la possibilité de traitements de patients souffrant de lymphopénie, particulièrement dans le cadre des infections virales chroniques et d'immunothérapies anti-tumorales.



Amnis® Imaging Flow Cytometry
Integrating flow cytometry and
microscopy to advance discovery

EMD Millipore is a division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany



This information is current as
of October 2, 2013.

IL-2 and IL-7 Determine the Homeostatic Balance between the Regulatory and Conventional CD4⁺ T Cell Compartments during Peripheral T Cell Reconstitution

Armelle Le Campion, Arnaud Pommier, Arnaud Delpoux,
Laurence Stouvenel, Cédric Auffray, Bruno Martin and
Bruno Lucas

J Immunol 2012; 189:3339-3346; Prepublished online 29
August 2012;

doi: 10.4049/jimmunol.1103152

<http://www.jimmunol.org/content/189/7/3339>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2012/08/29/jimmunol.1103152.DC1.html>

References This article **cites 58 articles**, 29 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/189/7/3339.full#ref-list-1>

Subscriptions Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscriptions>

Permissions Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>



IL-2 and IL-7 Determine the Homeostatic Balance between the Regulatory and Conventional CD4⁺ T Cell Compartments during Peripheral T Cell Reconstitution

Armelle Le Campion,¹ Arnaud Pommier,¹ Arnaud Delpoux, Laurence Stouvenel, Cédric Auffray, Bruno Martin,² and Bruno Lucas²

Work over the last decades has led to the identification of the factors that influence the survival and homeostasis of conventional T cells. IL-7 and TCR signaling promote the survival of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in lymphoreplete mice and their proliferation in a lymphopenic environment, whereas survival and homeostatic proliferation of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells crucially depend on a combination of IL-7 and IL-15. In contrast, there is little information regarding the factors driving the proliferation of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia. In this study, we investigated whether regulatory CD4⁺ T cell proliferation in response to lymphopenia was guided by classical homeostatic resources, such as IL-2, IL-7, or TCR–MHC interactions. Altogether, our data suggest that, although homeostatic proliferation of conventional naive CD4⁺ T cells is closely related to IL-7 levels, the proliferation of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia appears to be primarily controlled by IL-2. The capacity of IL-7 to augment conventional T cell proliferation with minimal concomitant regulatory T cell expansion may be clinically exploitable in the treatment of patients with lymphopenia, especially in the case of chronic viral diseases or cancer immunotherapy. *The Journal of Immunology*, 2012, 189: 3339–3346.

The size of the peripheral T cell pool is notably constant, despite continuous output from the thymus, turnover of existing cells, and clonal expansion of Ag-specific cells in the course of an immune response (1). This process is achieved through several homeostatic mechanisms that regulate both cell survival and proliferation. Environmental factors that regulate these responses vary, depending on the T cell subset and on the nature, naive or memory, of the T cell (2). The precise identification of these factors regulating T cell homeostasis appears to be crucial for the development of new strategies and clinical trials for future immunotherapy, such as cancer or antiviral therapies, or in the context of autoimmunity and lymphoproliferative diseases.

Work over the last decades established a critical role for cytokines in the maintenance and homeostatic proliferation of memory T cells (2). More precisely, it was shown that survival and homeostatic proliferation of memory CD8⁺ and CD4⁺ T cells crucially depend on a combination of IL-7 and IL-15 (3–7). However, optimum memory CD4⁺ T cell function may depend on interactions with

MHC II molecules (8). In contrast, it was shown that disruption of MHC class I molecule–TCR interactions did not affect self-renewal, function, or survival of memory CD8⁺ T cells (9).

Numerous studies have led to the identification of the factors that influence the survival and homeostasis of naive T cells (10). In physiological settings, IL-7 and TCR signaling promote the survival and normal function of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells (11–13). In a lymphopenic environment, the same cues promote the proliferation of these cells (14, 15). More precisely, naive CD4⁺ T cells can be divided into two subsets as a function of their behavior after transfer into lymphopenic mice (16, 17). On the one hand, a small proportion of the initially injected CD4⁺ T cells expands strongly in response to interactions with self-peptides or commensal bacterium-derived peptides presented by MHC class II molecules. IL-7 is not required for this process, which is called “spontaneous proliferation” (18). On the other hand, the vast majority of injected naive T cells cycles slowly in response to the great availability of IL-7 in lymphopenic environments (19). TCR signaling can also synergize with IL-7 to enhance this latter process, which is called “homeostatic T cell proliferation” (18).

It is well established that IL-2 is essential for regulatory CD4⁺ T cell survival in the periphery (20–22). Accordingly, defective IL-2 signaling leads to spontaneous lymphoproliferative and autoimmune diseases in mice and humans because of the impaired development and function of these cells (23). Surprisingly, there is little information regarding the factors driving the proliferation of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia. Cozzo et al. (24) and Hsieh et al. (25) proposed that this process is dependent on interactions with self-peptide/MHC complexes, but the role of ILs has not been clearly addressed.

In the present study, we investigated whether regulatory CD4⁺ T cell proliferation in response to lymphopenia was guided by “classical” homeostatic resources, such as IL-2, IL-7, or TCR–MHC interactions. We show that proliferation of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia is not controlled by IL-7 levels but rather requires IL-2 production by conventional CD4⁺ T cells.

Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8104, Cochin Hospital, 75014 Paris, France; INSERM U1016, Cochin Hospital, 75014 Paris, France; and Paris Descartes University, Cochin Hospital, 75014 Paris, France

¹A.L.C. and A.P. contributed equally to this work.

²B.M. and B.L. contributed equally to this work.

Received for publication November 3, 2011. Accepted for publication July 26, 2012.

This work was supported by a grant from the Ligue contre le Cancer and by a grant from the Association pour la Recherche contre le Cancer. A.L.C. was supported by a fellowship from the Centre National de la Recherche Scientifique. A.P. was supported by a Ph.D. fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Bruno Martin and Dr. Bruno Lucas, Cochin Hospital, 27 Rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. E-mail addresses: bruno.martin@inserm.fr (B.M.) and bruno.lucas@inserm.fr (B.L.)

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CTv, CellTrace violet; LN, lymph node; MFI, mean fluorescence intensity.

Copyright © 2012 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/12/\$16.00

This result is of importance, because several clinical trials of recombinant human IL-7 are ongoing in the settings of acquired immunodeficiency, cancer, and chronic viral infection.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6 mice (CD45.2) were obtained from Harlan Laboratories. C57BL/6 CD45.1 mice and C57BL/6 CD3e^{-/-} mice were maintained in our own animal facilities under specific pathogen-free conditions. C57BL/6 CD3e^{-/-} mice (26) were crossed with MHC II^{ΔΔ} mice (27) to obtain CD3e/MHC II double-deficient mice (CD3e^{-/-} II^{ΔΔ} mice) (13). C57BL/6 Foxp3-GFP reporter mice were initially provided by Dr. Bernard Malissen (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France) (28, 29) and maintained in our own animal facilities. Experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Veterinary Department.

Cell suspensions

Peripheral and mesenteric lymph nodes (LNs) and spleen tissue were homogenized and passed through a nylon cell strainer (BD Falcon) in RPMI 1640 Glutamax (Life Technologies), supplemented with 10% FCS (Biochrom) for adoptive transfer (LNs only), or in 5% FCS, 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) in PBS for flow cytometry (pooled LN and spleen cells - periphery).

Adoptive transfer of CD4⁺ T cells

LN cells (pooled superficial cervical, axillary, brachial, inguinal, and mesenteric LNs) were incubated on ice for 20 min with a mixture of anti-CD8 (53-6.7), anti-CD11b (Mac-1), anti-GR1 (8C5), and anti-CD19 (1D3) Abs, obtained from hybridoma supernatants, and then with magnetic beads coupled to anti-rat IgG (DynaL Biotech). Purified T cell subsets were generally 95–97% pure. When indicated, CD4⁺ T cells were labeled with 5 μM CFSE (Molecular Probes) before injection. In some experiments (Fig. 6), regulatory GFP-Foxp3⁺ CD4⁺ T cells from C57BL/6 Foxp3-GFP reporter mice were FACS sorted in a MoFlo XDP flow cytometer (Beckman Coulter). Regulatory GFP-Foxp3⁺ CD4⁺ T cells were then labeled with a 5 μM CellTrace violet proliferation kit (Invitrogen), according to the manufacturer's guidelines, before injection. Purified CD4⁺ T cells (5 × 10⁶ cells) and/or regulatory CD4⁺ T cells (1 × 10⁶ cells) were injected i.v. into sex-matched lymphopenic recipient mice.

In vivo treatment with anti-IL-7R and/or anti-IL-2-blocking Abs and IL-2 immune complexes

In the experiments depicted in Figs. 4 and 6, mice were injected i.p. every 2 d, beginning at the time of cell transfer, with anti-IL-2 Abs (S4B6 and JES6-1A12, 200 μg each/mouse; Bio X Cell) and/or anti-IL-7Rα Ab (A7R34, 200 μg/mouse) obtained from hybridoma supernatants. In some experiments (Fig. 5), mice were injected i.p. every 2 d with IL-2/anti-IL-2 complexes, beginning at the time of cell transfer. IL-2/anti-IL-2 complexes were made, as previously described (30), by mixing 2 μg recombinant mouse IL-2 (0.5 μg/mouse; PeproTech) with 10 μg anti-IL-2 Ab (clone S4B6, 2.5 μg/mouse; Bio X Cell).

Cell surface staining and flow cytometry

Cell suspensions were collected and dispensed into 96-well round-bottom microtiter plates (Greiner Bioscience; 6 × 10⁶ cells/well). Surface staining was performed by incubating the cells on ice, for 15 min/step, with Abs in 5% FCS (Biochrom), 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) in PBS. Each cell-staining reaction was preceded by a 15-min incubation with purified anti-CD16/32 Abs (FcγRII/III block, 2.4G2) obtained from hybridoma supernatants.

Peridin chlorophyll protein-conjugated anti-CD4 Ab (RM4-5), FITC-conjugated anti-CD25 Ab (7D4), PE cyanin 7-conjugated anti-CD3 Ab (145-2C11), biotinylated anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104), anti-CD25 (PC61), allophycocyanin-H7-conjugated anti-CD8α (53-6.7), Pacific Blue-conjugated anti-CD4 (RM4-5), allophycocyanin-conjugated anti-CD45.1 (A20), and allophycocyanin-conjugated streptavidin were obtained from BD Biosciences. Allophycocyanin-Alexa Fluor 750-conjugated anti-CD8α Ab (53-6.7) and biotinylated anti-CD127 (A7R34) Ab were obtained from eBioscience. Pacific Blue-conjugated streptavidin was obtained from Invitrogen.

For intranuclear Foxp3 staining, cells were fixed and permeabilized with the eBioscience Foxp3 staining buffer set and then stained with PE-conjugated anti-Foxp3 Ab (FJK-16s). Four- and seven-color immunofluo-

rescence analyses were carried out with a FACSCalibur flow cytometer and a BDLSRII flow cytometer, respectively (BD Biosciences). List-mode data files were analyzed with CellQuest and Diva software (BD Biosciences).

In vitro culture assay

LN cells were incubated on ice for 20 min with anti-CD8 (53-6.7), anti-CD11b (Mac-1), anti-GR1 (8C5), and anti-CD19 (1D3) Abs, obtained from hybridoma supernatants, and then with magnetic beads coupled to anti-rat Ig (DynaL Biotech). Purified CD4⁺ T cells were labeled with biotinylated anti-CD25 (clone PC61) Ab. Then, CD25⁺ and CD25⁻ T cells were separated using MACS streptavidin MicroBeads (Miltenyi Biotec). CD25⁺ CD4⁺ T cells (50 × 10³) and CD25⁻ CD4⁺ T cells (50 × 10³) were cultured separately in the presence or absence of recombinant human IL-2 (10 ng/ml) or recombinant mouse IL-7 (10 ng/ml) (both from R&D Systems).

Calculations

The average number of cell cycles was calculated as follows. First, we estimated the CFSE dilution factor (*f*): CFSE mean fluorescence intensity (MFI) of nondivided cells (cycle 0) divided by CFSE MFI of the entire CFSE⁺ cell subset. Then, because the intracellular amount of CFSE is halved during each cell cycle, the average number of cell cycles (*A*) was calculated using the following formula: $A = \log_2(f)$.

Statistics

Data are expressed as mean ± SEM, and the significance of differences between two series of results was assessed using the Student unpaired or paired *t* test. The *p* values <0.05 were considered significant.

Results

IL-7 alone does not drive homeostatic proliferation of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia

Our study was conducted by transferring 5 × 10⁶ CD4⁺ T cells from C57BL/6 mice, labeled with CFSE, into lymphopenic C57BL/6 CD3e^{-/-} mice lacking or not lacking MHC class II molecule expression. No cell division was detected for the first 2 d after transfer (Fig. 1A). Two weeks later, in both recipients, some recovered cells had undergone a limited number of divisions, whereas the intracytoplasmic dye had totally disappeared from others. Thus, as previously described by us and other investigators (13, 16–18), we confirmed that CD4⁺ T cells from normal C57BL/6 mice can be divided into two subsets with respect to their behavior after transfer into lymphopenic mice. The first subset (CFSE⁺ CD4⁺ T cells), corresponding to the vast majority of transferred CD4⁺ T cells, cycles very slowly; this process is called “homeostatic T cell proliferation.” The second subset (CFSE⁻ CD4⁺ T cells) is generated by the strong expansion of a small proportion of injected CD4⁺ T cells (31). This process is termed “spontaneous proliferation” (17, 18) and requires interactions with MHC molecules (13).

To study the homeostatic proliferation of conventional and regulatory CD4⁺ T cells, we focused on CFSE⁺ CD4⁺ T cells. As previously reported (13), we observed a similar proliferation pattern of conventional CD4⁺ T cells (CFSE⁺ Foxp3⁻ CD4⁺) in both recipient mice (Fig. 1A, 1B). This slow and limited proliferation of naive CD4⁺ T cells is known to result directly from the greater availability of IL-7 in lymphopenic environments (19, 32, 33). In contrast, although regulatory CD4⁺ T cells (CFSE⁺ Foxp3⁺ CD4⁺) were able to proliferate even more strongly than were their conventional CD4⁺ T cell counterparts after transfer into lymphopenic MHC class II-expressing recipient mice, this proliferating capacity appeared to be strongly compromised in mice lacking the expression of MHC class II molecules (Fig. 1A, 1B). Consequently, the proportion of regulatory CD4⁺ T cells among CFSE⁺ CD4⁺ T cells decreased with time after transfer into CD3e^{-/-} mice lacking the expression of MHC class II molecules (Fig. 1C), reflecting, in this setting, a progressive dysregulation of the homeostatic balance between regulatory and conventional CD4⁺ T cells.

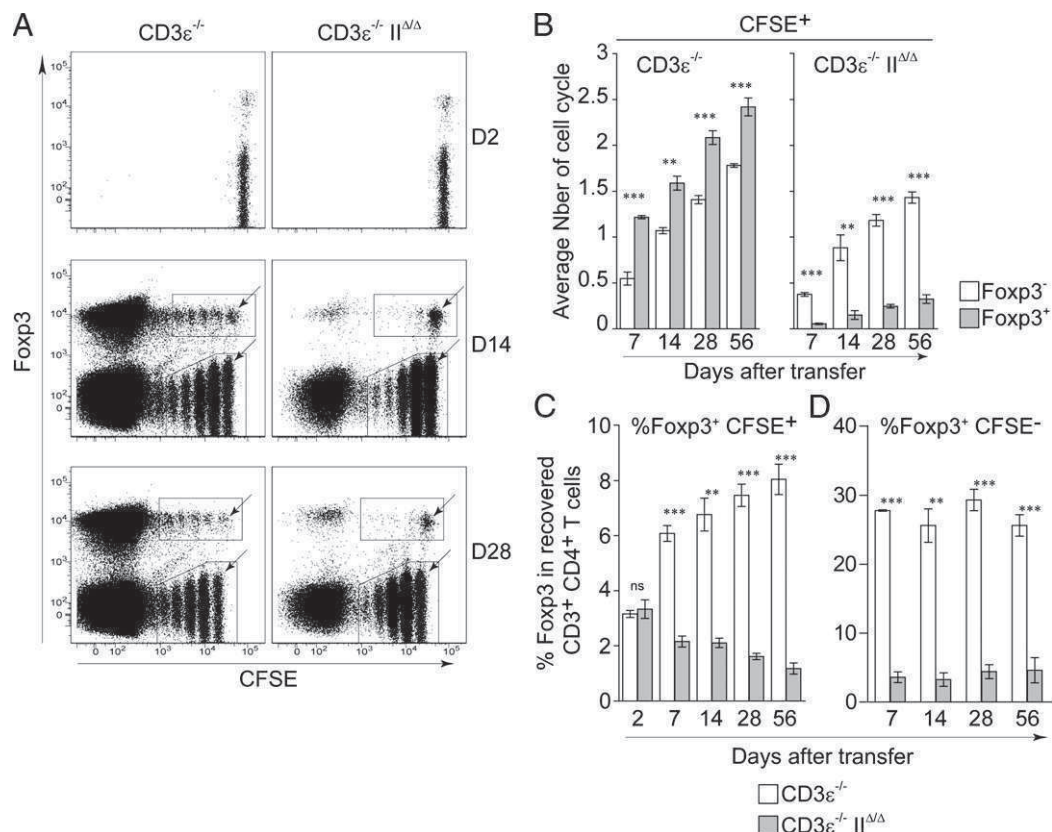


FIGURE 1. Homeostatic proliferation of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia requires MHC class II molecule expression. CFSE-labeled LN CD4⁺ T cells (5×10^6) from C57BL/6 mice were injected i.v. into C57BL/6 CD3ε^{-/-} mice and C57BL/6 CD3ε^{-/-} MHC II^{ΔΔ} mice. At various times after transfer, LNs and spleen were recovered and pooled, and single-cell suspensions were prepared. **(A)** Fopx3/CFSE dot plots of CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells from representative recipient mice 2, 14, and 28 d after transfer. Arrows in each dot plot indicate nondivided conventional and Fopx3⁺ regulatory CD4⁺ T cells. **(B)** Average number of cell cycles undergone by CFSE⁺ Fopx3⁺ CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells and CFSE⁺ Fopx3⁻ CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells recovered from C57BL/6 CD3ε^{-/-} and C57BL/6 CD3ε^{-/-} MHC II^{ΔΔ} recipient mice at various times after transfer. Results are expressed as means \pm SEM for three independent experiments. **(C)** Proportion of CFSE⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ T cells expressing Fopx3 at various times after transfer. Results are expressed as means \pm SEM for three independent experiments. **(D)** Proportion of CFSE⁻ CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ T cells expressing Fopx3 at various times after transfer. Results are expressed as means \pm SEM for three independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Lymphopenia-induced T cell spontaneous proliferation is thought to strictly depend on interactions with MHC molecules (13). Accordingly, very few CFSE⁻ cells were generated at early time points after transfer into mice lacking MHC class II molecules (Fig. 1A, Supplemental Fig. 1). We showed previously that these cells are, in fact, responding to MHC class I molecules (13). Interestingly, these rare cells included, in proportion, less regulatory CD4⁺ T cells than when recipient mice were expressing MHC class II molecules (Fig. 1D).

Thus, the greater availability of IL-7 found in lymphopenic environments is not able to induce homeostatic proliferation of regulatory CD4⁺ T cells by itself. As proposed by Cozzo et al. (24) and Hsieh et al. (25), our data suggest that, in contrast with their conventional CD4⁺ T cell counterparts, homeostatic T cell proliferation of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia requires both IL-7 and TCR signaling.

We then compared the expression level of IL-7Rα (CD127) on conventional and regulatory CFSE⁺ CD4⁺ T cells (Fig. 2). Park et al. (34) clearly demonstrated that high consumption of IL-7 led to a marked downregulation of its receptor, CD127. Thus, the study of CD127 expression on T cells in the course of peripheral T cell reconstitution may help us to evaluate whether IL-7 is consumed by these cells. Two days after their transfer into both CD3ε^{-/-} and CD3ε^{-/-} II^{ΔΔ} recipient mice, CD127 expression was strongly decreased in conventional CD4⁺ T cells (Fig. 2A).

This downregulation remained stable for 1 mo in MHC class II-expressing CD3ε^{-/-} recipient mice, whereas it rapidly returned to control levels in CD3ε^{-/-} II^{ΔΔ} recipient mice (Fig. 2B). This latter result may indicate that TCR signaling boosts IL-7 consumption and subsequent IL-7R downregulation. In contrast, at all studied time points, CD127 was not downregulated at the cell surface of regulatory CD4⁺ T cells in either group of recipient mice, indicating a weak consumption of IL-7 by these cells.

Taken together, these data suggest that, in contrast to their conventional CD4⁺ T cell counterparts, homeostatic proliferation of the regulatory CD4⁺ T cell pool in response to lymphopenia is independent of IL-7.

The extent of both homeostatic and spontaneous proliferations of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia requires IL-2 rather than IL-7

IL-2 was shown to be crucial for regulatory CD4⁺ T cell homeostasis in the periphery. Moreover, IL-2 allows regulatory CD4⁺ T cells to proliferate in vitro in response to anti-CD3 Ab stimulation. Thus, we decided to compare, in vitro and in vivo, the effect of IL-2 and IL-7 on the survival and lymphopenia-induced proliferation of conventional and regulatory CD4⁺ T cells.

First, to ascertain whether IL-2 and/or IL-7 promote, in vitro, the survival of conventional and/or regulatory CD4⁺ T cells, CD25⁻ and CD25⁺ CD4⁺ T cell subsets from C57BL/6 mice were cul-

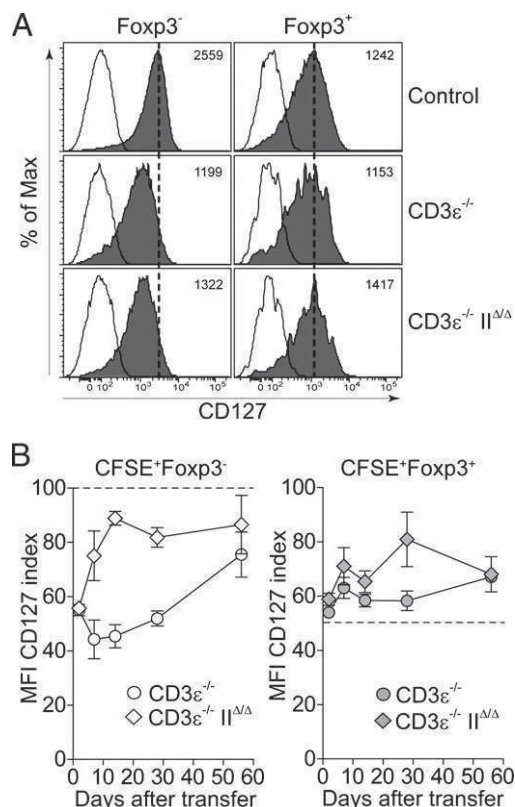


FIGURE 2. CD127 expression on conventional and regulatory CD4⁺ T cells undergoing homeostatic proliferation in response to lymphopenia. CFSE-labeled LN CD4⁺ T cells (5×10^6) from C57BL/6 mice were injected i.v. into C57BL/6 CD3ε^{-/-} mice and C57BL/6 CD3ε^{-/-} MHC II^{ΔΔ} mice. At various times after transfer, LNs and spleen were recovered and pooled, and single-cell suspensions were prepared. **(A)** CD127 fluorescence graphs (filled graphs) of CFSE⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells and CFSE⁺ Foxp3⁻ CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells recovered 2 d after transfer. CD127 fluorescence graphs of CD4⁺ T cells from control C57BL/6 mice are also shown. The open graphs represent isotype-stained cells. Number in each graph represents CD127 MFI. **(B)** CD127 expression of the indicated transferred cells at various times after transfer. Results are expressed as MFI index (CD127 MFI of the indicated recovered CD4⁺ T cells/CD127 MFI of conventional CD4⁺ T cells [Foxp3⁻] from control C57BL/6 mice $\times 100$). The dashed line represents the MFI index of Foxp3⁻ (left panel) and Foxp3⁺ (right panel) CD4⁺ T cells from control C57BL/6 mice. Results are expressed as means \pm SEM for two independent experiments with at least three mice per group and per day.

tured separately for 3 d, in the presence or absence of IL-2 or IL-7 (Fig. 3). As shown in Fig. 3A, in the absence of TCR stimulation, IL-7, but not IL-2, allowed the maintenance of conventional CD4⁺ T cell numbers. In contrast, we observed that the survival of regulatory CD4⁺ T cells in this setting was mainly dependent on the presence of IL-2. Nevertheless, we found that IL-7 as well significantly supported the survival of these cells in vitro, although to a lesser extent than IL-2 (Fig. 3A). Thus, regulatory CD4⁺ T cells, although they express lower surface levels of CD127 than conventional CD4⁺ T cells, could respond to IL-7. In addition, we verified that the proportion of Foxp3⁺ CD4⁺ T cells in the CD25⁺ CD4⁺ T cell culture remained stable over time, and that we could detect only few Foxp3-expressing cells in the CD25⁻ CD4⁺ T cell culture (Fig. 3B).

We next investigated the respective role of IL-2 and IL-7 in the proliferation of regulatory CD4⁺ T cells observed in MHC class II-expressing lymphopenic recipient mice. To address this question, 5×10^6 CFSE-labeled CD4⁺ T cells from C57BL/6 mice were

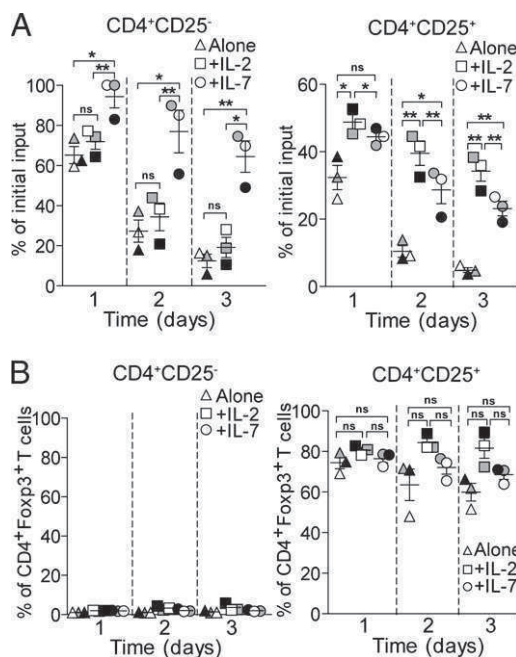


FIGURE 3. In vitro survival of regulatory CD4⁺ T cells depends mainly on IL-2 in the absence of TCR stimulation. Purified LN CD25⁻ and CD25⁺ CD4⁺ T cells from C57BL/6 mice were cultured separately for 3 d with medium alone or in the presence of IL-2 or IL-7. **(A)** Absolute numbers of recovered CD4⁺ T cells 1, 2, and 3 d after the onset of culture. **(B)** Proportion of CD4⁺ T cells expressing Foxp3 1, 2, and 3 d after the onset of culture. Black-, gray-, and white-filled symbols represent individual experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

injected into CD3ε^{-/-} mice that were treated or not with anti-IL-7R, anti-IL-2, or both blocking Abs (Fig. 4). Fourteen days after transfer, homeostatic proliferation of regulatory CD4⁺ T cells was clearly reduced in mice treated with anti-IL-2 Ab (Fig. 4A, 4B). Accordingly, anti-IL-2 Ab treatment resulted in a decrease of the proportion of regulatory CD4⁺ T cells among CFSE⁺ CD4⁺ T cells (Fig. 4C). In contrast, we observed that administration of anti-IL-7R Abs preferentially affected the homeostatic proliferation of conventional CD4⁺ T cells (Fig. 4A, 4B). Consequently, this latter treatment resulted in a strong increase in the proportion of regulatory CD4⁺ T cells among CFSE⁺ CD4⁺ T cells (Fig. 4C). Anti-IL-7R Abs have a weak, although significant, effect on the homeostatic proliferation of regulatory CD4⁺ T cells.

As previously reported by many groups, IL-7 deprivation had only a modest and nonsignificant effect on lymphopenia-induced T cell spontaneous proliferation (Fig. 4D). In contrast, IL-2 deprivation resulted in a strong decrease in the proportion of regulatory CD4⁺ T cells among CFSE⁺ CD4⁺ T cells. Thus, IL-2 synergizes with TCR signals to increase the magnitude of regulatory CD4⁺ T cell spontaneous proliferation in response to lymphopenia.

Altogether, our results strongly suggest that, during immune reconstitution, the balance between the regulatory and the conventional CD4⁺ T cell compartments is closely related to IL-2 and IL-7 levels in vivo.

IL-2 alone is sufficient to drive regulatory T cell homeostatic proliferation

A total of 5×10^6 CFSE-labeled CD4⁺ T cells was injected into CD3ε^{-/-} MHC II^{ΔΔ} mice treated or not with IL-2/anti-IL-2 complexes (35). Untreated MHC II-expressing CD3ε^{-/-} recipient mice were also studied in parallel (Fig. 5). Proliferation of transferred CD4⁺ T cells was analyzed 14 d after transfer. Administration of IL-2–

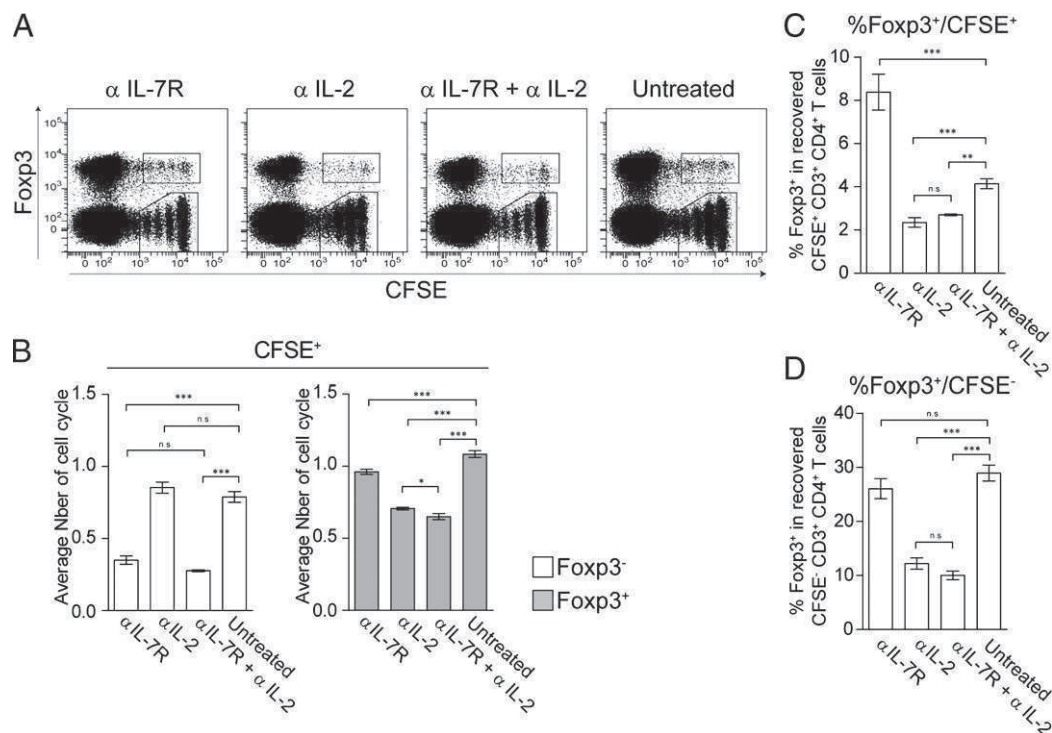


FIGURE 4. Homeostatic proliferation of regulatory $CD4^+$ T cells in response to lymphopenia relies mainly on IL-2. CFSE-labeled LN $CD4^+$ T cells (5×10^6) from C57BL/6 mice were injected i.v. into lymphopenic C57BL/6 $CD3\epsilon^{-/-}$ mice treated or not with anti-IL-2, anti-IL-7 α , or both blocking Abs. Fourteen days after transfer, LNs and spleen were recovered and pooled, and single-cell suspensions were prepared. **(A)** Foxp3/CFSE dot plots of $CD4^+$ $CD3^+$ $CD8^-$ T cells from representative recipient mice 14 d after transfer. **(B)** Average number of cell cycles of $CFSE^+$ $Foxp3^-$ $CD4^+$ $CD3^+$ $CD8^-$ T cells and $CFSE^+$ $Foxp3^+$ $CD4^+$ $CD3^+$ $CD8^-$ T cells 14 d after transfer. Results are shown as means \pm SEM for three independent experiments. **(C)** Proportion of recovered $CFSE^+$ $CD3^+$ $CD4^+$ T cells expressing Foxp3 14 d after transfer. Results are shown as means \pm SEM for two independent experiments with at least three mice/group. **(D)** Proportion of recovered $CFSE^-$ $CD3^+$ $CD4^+$ T cells expressing Foxp3 14 d after transfer. Results are shown as means \pm SEM for two independent experiments with at least three mice/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

agonist complexes partially restored the homeostatic proliferation of regulatory $CD4^+$ T cells injected into lymphopenic mice lacking expression of MHC class II molecules, whereas the homeostatic proliferation of conventional $CD4^+$ T cells remained unchanged (Fig. 5A). More precisely, we observed a 6-fold increase in the average number of divisions of regulatory $CD4^+$ T cells when $CD3\epsilon^{-/-}$ $II^{\Delta\Delta}$ mice were treated with IL-2/anti-IL-2 complexes (Fig. 5B). Consequently, this treatment resulted in a significant increase in the proportion of regulatory $CD4^+$ T cells among $CFSE^+$ $CD4^+$ T cells (Fig. 5C). Thus, ILs are able to drive the homeostatic proliferation of both conventional and regulatory $CD4^+$ T cells independently of TCR signaling. However, although the homeostatic proliferation of conventional $CD4^+$ T cells is closely related to IL-7 levels, the proliferation of regulatory $CD4^+$ T cells appears to be primarily controlled by IL-2.

As noted above (Fig. 1), in the absence of MHC class II molecules, very few regulatory T cells were contained within $CFSE^-$ $CD4^+$ T cells recovered from the periphery of recipient mice 14 d after transfer. IL-2 treatment led to a significant increase in the proportion (Fig. 5D) and absolute number (Supplemental Fig. 2) of regulatory T cells among $CFSE^-$ $CD4^+$ T cells, confirming that IL-2 plays a role in the extent of regulatory $CD4^+$ T cell spontaneous expansion in response to lymphopenia.

Regulatory $CD4^+$ T cells receive help from conventional $CD4^+$ T cells to undergo homeostatic proliferation in response to lymphopenia

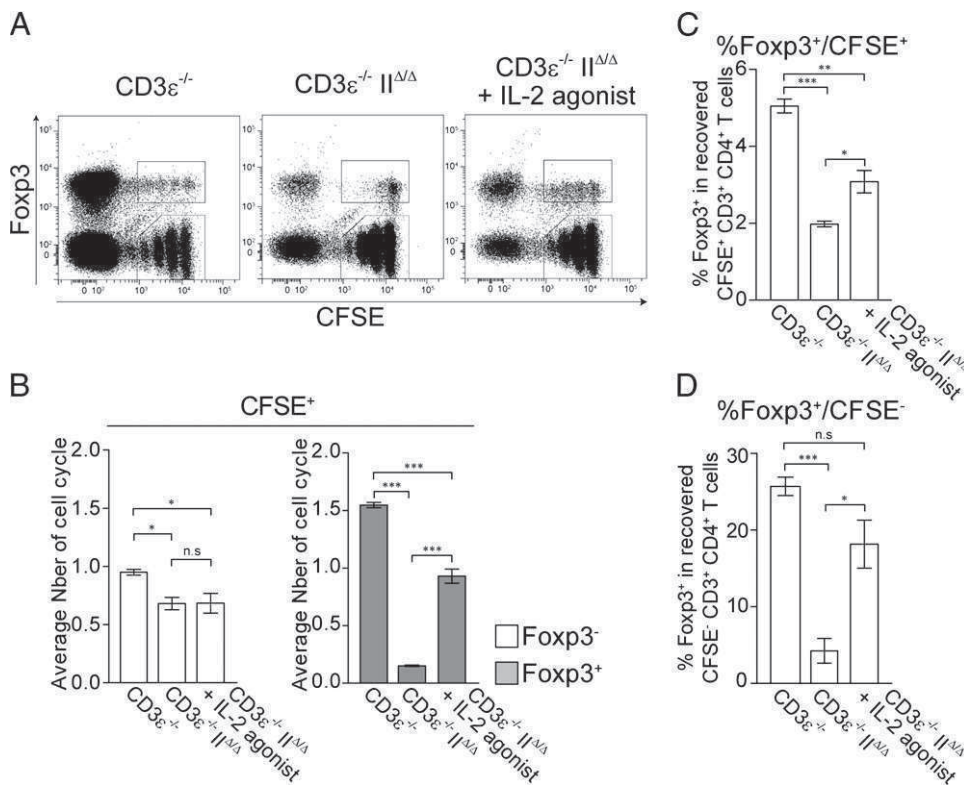
Because we noticed that IL-2 was a crucial factor in driving the homeostatic proliferation of regulatory $CD4^+$ T cells in response to lymphopenia, we speculated that such a process requires assis-

tance from conventional T cells. To address this hypothesis directly, 1×10^6 FACS-sorted, regulatory $CD4^+$ T cells from C57BL/6 Foxp3-GFP $CD45.2$ mice, labeled with CellTrace violet (CTv), were injected alone or with 5×10^6 conventional $CD4^+$ T cells from C57BL/6 $CD45.1$ mice into $CD45.1$ $CD3\epsilon^{-/-}$ mice. Proliferation of transferred regulatory $CD45.2^+$ GFP $^+$ $CD4^+$ T cells was analyzed 14 d after transfer (Fig. 6). When injected alone, regulatory $CD4^+$ T cells underwent homeostatic proliferation. This proliferation required MHC class II molecule expression and was strongly decreased by IL-2 deprivation (Fig. 6A, 6B). Interestingly, spontaneous proliferation of regulatory $CD4^+$ T cells in response to lymphopenia was completely abolished in the absence of MHC class II molecule expression. As described by Duarte et al. (36), when injected alone, some regulatory $CD4^+$ T cells lost Foxp3 expression and underwent spontaneous proliferation in response to lymphopenia that induced CTv complete dilution and their accumulation as CTv $^-$ GFP $^-$ $CD45.2^+$ $CD4^+$ T cells. These converted cells may provide the IL-2 required for the homeostatic proliferation of regulatory $CD4^+$ T cells. Interestingly, regulatory $CD4^+$ T cell homeostatic proliferation was significantly increased when regulatory $CD4^+$ T cells were coinjected with conventional T cells (Fig. 6C, 6D). Thus, the presence of conventional T cells at the moment of the transfer significantly increased the extent of regulatory T cell homeostatic proliferation, strongly suggesting that conventional $CD4^+$ T cells are providing the resources (IL-2) required for this process.

Discussion

Several situations lead to T cell lymphopenia, such as chemotherapy, radiotherapy, and viral infections. In the last decade,

FIGURE 5. IL-2 is able to induce the proliferation of regulatory CD4⁺ T cells independently of self-recognition. CFSE-labeled LN CD4⁺ T cells (5×10^6) from C57BL/6 mice were injected into C57BL/6 CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice and C57BL/6 CD3 $\epsilon^{-/-}$ IL $\Delta\Delta$ mice treated or not treated with IL-2/anti-IL-2 complexes. Fourteen days after transfer, LNs and spleen were recovered and pooled, and single-cell suspensions were prepared. **(A)** Foxp3/CFSE dot plots of CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells recovered from representative recipient mice 14 d after transfer. **(B)** Average number of cell cycles of CFSE⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells and CFSE⁺ Foxp3⁻ CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells 14 d after transfer. **(C)** Proportion of CFSE⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ T cells expressing Foxp3. Results are shown as means \pm SEM for two independent experiments with at least three mice/group. **(D)** Proportion of CFSE⁻ CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ T cells expressing Foxp3. Results are shown as means \pm SEM for two independent experiments with at least three mice/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



several groups, including our own, have tried to decipher the mechanisms that could help to replenish the peripheral T cell pool after a lymphopenic episode. On one hand, it was shown that the bulk of naive T cells proliferate slowly in response to lymphopenia. Such a process has been termed “homeostatic proliferation,” and it relies on both TCR signaling and the greater availability of IL-7 found in

lymphopenic environments (13, 37, 38); these are the two main factors ensuring naive T cell survival in a nonlymphopenic environment (10). On the other hand, in the case of profound lymphopenia, some naive CD4⁺ T cells are able to proliferate and expand strongly, a process known as spontaneous proliferation, which relies primarily on interactions with MHC class II molecules (18, 31).

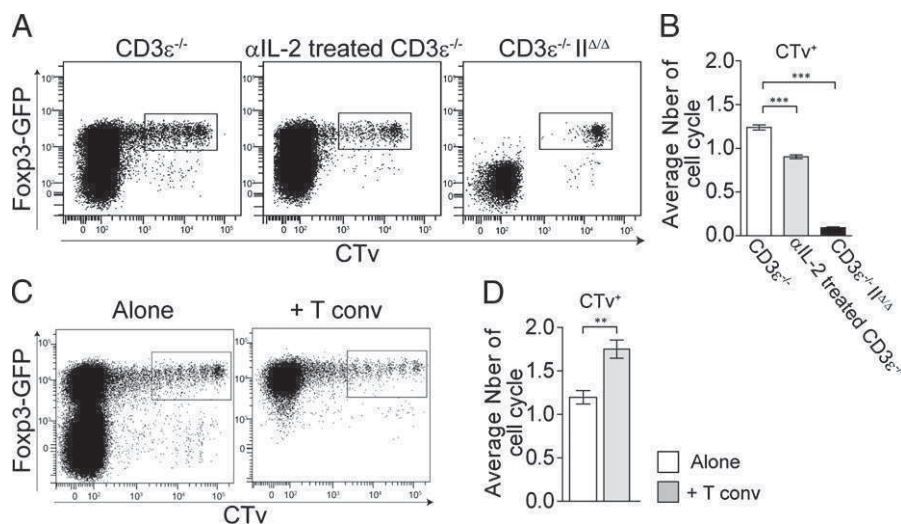


FIGURE 6. Regulatory CD4⁺ T cells need help from conventional CD4⁺ T cells to undergo homeostatic proliferation in response to lymphopenia. A total of 1×10^6 Foxp3-GFP⁺ CD4⁺ T cells from the LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice was FACS sorted, labeled with CTv, and injected i.v. into lymphopenic C57BL/6 CD3 $\epsilon^{-/-}$ IL $\Delta\Delta$ mice and C57BL/6 CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice treated or not treated with IL-2-anti-blocking Abs. **(A)** Foxp3-GFP/CTv dot plots of CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells recovered from representative recipient mice 14 d after transfer. **(B)** Average number of cell cycles of recovered CTv⁺ Foxp3-GFP⁺ CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells, 14 d after transfer. Results are shown as means \pm SEM for two independent experiments with at least three mice/group. A total of 1×10^6 Foxp3-GFP⁺ CD4⁺ T cells from the LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice was FACS sorted, labeled with CTv, and injected i.v. alone or with 5×10^6 CD25⁻ CD4⁺ T cells from normal C57BL/6 CD45.1 mice into lymphopenic CD45.1 C57BL/6 CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice. Fourteen days after transfer, LNs and spleen were recovered and pooled, and single-cell suspensions were prepared. **(C)** Foxp3-GFP/CTv dot plots of CD45.2⁺ CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells recovered from representative recipient mice 14 d after transfer. **(D)** Average number of cell cycles of recovered CTv⁺ Foxp3-GFP⁺ CD45.2⁺ CD4⁺ CD3⁺ CD8⁻ T cells 14 d after transfer. Results are shown as means \pm SEM for two independent experiments with at least three mice/group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In contrast, little is known about the factors mediating the proliferation of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia. We show that IL-7 is not involved in the spontaneous proliferation of both regulatory and conventional CD4⁺ T cells in response to lymphopenia. Furthermore, although IL-7 is crucial for naive CD4⁺ T cell homeostatic proliferation in response to lymphopenia, it has minimal impact on the homeostatic proliferation of regulatory CD4⁺ T cells. These results agree with previous data showing that the maintenance of the regulatory CD4⁺ T cell pool in the periphery does not require IL-7 (39). Nevertheless, as shown by us (Fig. 3) and other investigators (40), IL-7 is able to significantly increase regulatory CD4⁺ T cell survival in vitro. Thus, although regulatory CD4⁺ T cells express very low surface levels of IL-7R, they are still able to integrate IL-7-mediated signals. However, the concentrations of IL-7 used in in vitro assays (10–50 ng/ml) are higher than the concentrations reached, in vivo, in a lymphopenic environment [\sim 50 pg/ml in the serum of T cell-deficient mice (19)]. Interestingly, after injection into lymphopenic recipient mice expressing or not expressing MHC class II molecules, IL-7R surface levels on conventional CD4⁺ T cells decreased to the levels observed on regulatory CD4⁺ T cells but not to lower levels. Altogether, our results suggest that IL-7R expression on regulatory CD4⁺ T cells may be too low to enable them to respond to the IL-7 levels reached in a lymphopenic environment. In line with this hypothesis, it was shown that regulatory CD4⁺ T cells are able to proliferate in vivo in response to the high levels of IL-7 reached in IL-7-transgenic mice or in mice injected with high concentrations of exogenous IL-7/anti-IL-7 complexes (41, 42).

The data presented in this article demonstrate that IL-2, a key cytokine for the development of regulatory CD4⁺ T cells in the thymus and their homeostasis in the periphery, is also crucial to drive their proliferation in response to lymphopenia. More precisely, the extent of both spontaneous and homeostatic proliferation of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia is strongly diminished by blocking IL-2 through injection of anti-IL-2 Abs. Such a conclusion may seem contradictory to previous data showing that IL-2 neutralization does not affect the lymphopenia-induced proliferation of regulatory CD4⁺ T cells (20). However, in this study, the investigators injected few CD4⁺ T cells (3×10^5) into lymphopenic recipients and analyzed their proliferation quite soon after transfer (4 d). In fact, they were only studying lymphopenia-induced spontaneous proliferation of regulatory T cells (homeostatic proliferation has not started after only 4 d) and, with such a protocol, the T cell compartment was far from being replenished at that time point. In the current study, by injecting 5×10^6 CD4⁺ T cells, reconstitution was already completed 1 wk after transfer (Supplemental Fig. 1), and we studied the effect of IL-2 neutralization 1 wk later (Fig. 4). It may be that IL-2 plays a role in increasing regulatory T cell half-life once the T cell compartment has been filled, thus allowing their accumulation with time rather than being required for the proliferation process itself. Such a hypothesis fits with our previous study suggesting that IL-2 is not absolutely required for regulatory T cell spontaneous proliferation in response to lymphopenia (31), as well as with previous data demonstrating that, after reconstitution of the peripheral T cell pool, the number of regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells (43, 44).

Cozzo et al. (24) and Hsieh et al. (25), using TCR-transgenic regulatory CD4⁺ T cells, proposed that self-peptides drive the proliferation of regulatory CD4⁺ T cells in response to lymphopenia. Our data showing that regulatory T cells do not undergo homeostatic proliferation after transfer into T cell-deficient mice lacking the expression of MHC class II molecules support such

a conclusion. However, as proposed by Carneiro et al. (45), our data may reflect, in part, an indirect role for interactions with MHC class II molecules. Indeed, such interactions could also be required to allow conventional CD4⁺ T cells to produce IL-2 that, in turn, drives the homeostatic proliferation of regulatory CD4⁺ T cells. Accordingly, our data strongly suggest that regulatory CD4⁺ T cells receive help from conventional CD4⁺ T cells to undergo homeostatic proliferation in response to lymphopenia. Moreover, IL-2 is able to drive regulatory CD4⁺ T cell homeostatic proliferation independently of interactions with MHC class II molecules. Indeed, injection of IL-2-agonist complexes partially restores the homeostatic proliferation of regulatory CD4⁺ T cells transferred into recipient mice deficient for the expression of MHC class II molecules. Thus, interactions with MHC class II molecules are required for the bulk of regulatory T cells to proliferate slowly in response to lymphopenia; however, it is difficult to determine whether such interactions act directly by stimulating regulatory T cells, indirectly by promoting IL-2 production by conventional T cells, or both.

Altogether, our data suggest that, although the homeostatic proliferation of conventional CD4⁺ T cells in response to lymphopenia is closely related to IL-7 levels, both the homeostatic and spontaneous proliferation of regulatory CD4⁺ T cells appear to be primarily controlled by IL-2. Accordingly, IL-2 therapy in lymphopenic patients leads to increases in regulatory-like CD4 T cell counts at the expense of the conventional T cell compartment, leading to altered responses to pathogens (46–48). Conversely, administration of IL-7 in humans induces expansion of naive and memory T cell subsets (49–51) and, in some clinical trials, a relative decrease in the percentage of regulatory CD4⁺ T cells was observed (52). Thus, on one hand, the capacity of IL-7 to augment conventional T cell proliferation with minimal concomitant regulatory T cell expansion may be clinically exploitable in the treatment of patients with lymphopenia, especially in the case of chronic viral diseases (53) or cancer immunotherapy (54). On the other hand, increased systemic IL-7 levels during lymphopenia may lead to an imbalance between the conventional and regulatory T cell compartments at the expense of regulatory T cells and may exacerbate deleterious immune reactions, such as graft-versus-host disease (55) or autoimmunity (56–58).

Acknowledgments

We thank B. Malissen for providing Foxp3-GFP mice. We gratefully acknowledge K. Labroquère and M. Andrieu from the Cytométrie et Immunobiologie facility of the Cochin Institute.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Almeida, A. R., B. Rocha, A. A. Freitas, and C. Tanchot. 2005. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Semin. Immunol.* 17: 239–249.
- Surh, C. D., and J. Sprent. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29: 848–862.
- Becker, T. C., E. J. Wherry, D. Boone, K. Murali-Krishna, R. Antia, A. Ma, and R. Ahmed. 2002. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J. Exp. Med.* 195: 1541–1548.
- Judge, A. D., X. Zhang, H. Fujii, C. D. Surh, and J. Sprent. 2002. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* 196: 935–946.
- Tan, J. T., B. Ernst, W. C. Kieper, E. LeRoy, J. Sprent, and C. D. Surh. 2002. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J. Exp. Med.* 195: 1523–1532.
- Seddon, B., P. Tomlinson, and R. Zamoyka. 2003. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat. Immunol.* 4: 680–686.

7. Bradley, L. M., L. Haynes, and S. L. Swain. 2005. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol.* 26: 172–176.
8. Kassiotis, G., S. Garcia, E. Simpson, and B. Stockinger. 2002. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat. Immunol.* 3: 244–250.
9. Murali-Krishna, K., L. L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286: 1377–1381.
10. Takada, K., and S. C. Jameson. 2009. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 823–832.
11. Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Péronau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276: 2057–2062.
12. Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg, and C. D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8732–8737.
13. Martin, B., C. Bécourt, B. Bienvenu, and B. Lucas. 2006. Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4+ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood* 108: 270–277.
14. Tanchot, C., A. Le Campion, S. Léaument, N. Dautigny, and B. Lucas. 2001. Naive CD4(+) lymphocytes convert to anergic or memory-like cells in T cell-deprived recipients. *Eur. J. Immunol.* 31: 2256–2265.
15. Le Campion, A., C. Bourgeois, F. Lambolez, B. Martin, S. Léaument, N. Dautigny, C. Tanchot, C. Pénit, and B. Lucas. 2002. Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4538–4543.
16. Martin, B., C. Bourgeois, N. Dautigny, and B. Lucas. 2003. On the role of MHC class II molecules in the survival and lymphopenia-induced proliferation of peripheral CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6021–6026.
17. Min, B., G. Focaras, M. Meier-Schellersheim, and W. E. Paul. 2004. Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3874–3879.
18. Min, B., H. Yamane, J. Hu-Li, and W. E. Paul. 2005. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J. Immunol.* 174: 6039–6044.
19. Guimond, M., R. G. Veenstra, D. J. Grindler, H. Zhang, Y. Cui, R. D. Murphy, S. Y. Kim, R. Na, L. Hennighausen, S. Kurtulus, et al. 2009. Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 10: 149–157.
20. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201: 723–735.
21. D'Cruz, L. M., and L. Klein. 2005. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat. Immunol.* 6: 1152–1159.
22. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 6: 1142–1151.
23. Cheng, G., A. Yu, and T. R. Malek. 2011. T-cell tolerance and the multifunctional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells. *Immunol. Rev.* 241: 63–76.
24. Cozzo, C., J. Larkin, III, and A. J. Caton. 2003. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 171: 5678–5682.
25. Hsieh, C. S., Y. Liang, A. J. Tzysnik, S. G. Self, D. Liggitt, and A. Y. Rudensky. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 21: 267–277.
26. Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, and B. Malissen. 1995. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J.* 14: 4641–4653.
27. Madsen, L., N. Labrecque, J. Engberg, A. Dierich, A. Svejgaard, C. Benoist, D. Mathis, and L. Fugger. 1999. Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10338–10343.
28. Wang, Y., A. Kissenpfennig, M. Mingueneau, S. Richelme, P. Perrin, S. Chevrier, C. Genton, B. Lucas, J. P. DiSanto, H. Acha-Orbea, et al. 2008. Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 180: 1565–1575.
29. Delpoux, A., M. Poitrasson-Rivière, A. Le Campion, A. Pommier, P. Yakonowsky, S. Jacques, F. Letourneur, C. Randriamampita, B. Lucas, and C. Auffray. 2012. Foxp3-independent loss of regulatory CD4+ T-cell suppressive capacities induced by self-deprivation. *Eur. J. Immunol.* 42: 1237–1249.
30. Le Saout, C., M. Villard, C. Cabasse, C. Jacquet, N. Taylor, and J. Hernandez. 2010. IL-2 mediates CD4+ T cell help in the breakdown of memory-like CD8+ T cell tolerance under lymphopenic conditions. *PLoS ONE* 5: e12659.
31. Le Campion, A., M. C. Gagnerault, C. Auffray, C. Bécourt, M. Poitrasson-Rivière, E. Lallemand, B. Bienvenu, B. Martin, F. Lepault, and B. Lucas. 2009. Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. *Blood* 114: 1784–1793.
32. Fry, T. J., E. Connick, J. Falloon, M. M. Lederman, D. J. Liewehr, J. Spritzler, S. M. Steinberg, L. V. Wood, R. Yarchoan, J. Zuckerman, et al. 2001. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* 97: 2983–2990.
33. Napolitano, L. A., R. M. Grant, S. G. Deeks, D. Schmidt, S. C. De Rosa, L. A. Herzenberg, B. G. Herndier, J. Andersson, and J. M. McCune. 2001. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat. Med.* 7: 73–79.
34. Park, J. H., Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes, and A. Singer. 2004. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 21: 289–302.
35. Boyman, O., M. Kovar, M. P. Rubinstein, C. D. Surh, and J. Sprent. 2006. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* 311: 1924–1927.
36. Duarte, J. H., S. Zelenay, M. L. Bergman, A. C. Martins, and J. Demengeot. 2009. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur. J. Immunol.* 39: 948–955.
37. Seddon, B., G. Legname, P. Tomlinson, and R. Zamoyska. 2000. Long-term survival but impaired homeostatic proliferation of Naive T cells in the absence of p56lck. *Science* 290: 127–131.
38. Seddon, B., and R. Zamoyska. 2002. TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells. *J. Immunol.* 169: 3752–3759.
39. Peffault de Latour, R., H. C. Dujardin, F. Mishellany, O. Buren-Defranoux, J. Zuber, R. Marques, J. Di Santo, A. Cumano, P. Vieira, and A. Bandeira. 2006. Ontogeny, function, and peripheral homeostasis of regulatory T cells in the absence of interleukin-7. *Blood* 108: 2300–2306.
40. Wuest, T. Y., J. Willette-Brown, S. K. Durum, and A. A. Hurwitz. 2008. The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 84: 973–980.
41. Bosco, N., F. Agenes, and R. Ceredig. 2005. Effects of increasing IL-7 availability on lymphocytes during and after lymphopenia-induced proliferation. *J. Immunol.* 175: 162–170.
42. Simonetta, F., N. Gesterhann, K. Z. Martinet, M. Boniotto, P. Tissières, B. Seddon, and C. Bourgeois. 2012. Interleukin-7 influences FOXP3+CD4+ regulatory T cells peripheral homeostasis. *PLoS ONE* 7: e36596.
43. Almeida, A. R., N. Legrand, M. Papiernik, and A. A. Freitas. 2002. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J. Immunol.* 169: 4850–4860.
44. Almeida, A. R., B. Zaragoza, and A. A. Freitas. 2006. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J. Immunol.* 177: 192–200.
45. Carneiro, J., K. Leon, I. Caramalho, C. van den Dool, R. Gardner, V. Oliveira, M. L. Bergman, N. Sepúlveda, T. Paixão, J. Faro, and J. Demengeot. 2007. When three is not a crowd: a Crossregulation model of the dynamics and repertoire selection of regulatory CD4+ T cells. *Immunol. Rev.* 216: 48–68.
46. Zhang, H., K. S. Chua, M. Guimond, V. Kapoor, M. V. Brown, T. A. Fleisher, L. M. Long, D. Bernstein, B. J. Hill, D. C. Douek, et al. 2005. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Med.* 11: 1238–1243.
47. Weiss, L., F. A. Letimier, M. Carriere, S. Maiella, V. Donkova-Petrini, B. Targat, A. Benecke, L. Rogge, and Y. Levy. 2010. In vivo expansion of naive and activated CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cell populations in interleukin-2-treated HIV patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 10632–10637.
48. Gougeon, M. L., and F. Chiodi. 2010. Impact of gamma-chain cytokines on T cell homeostasis in HIV-1 infection: therapeutic implications. *J. Intern. Med.* 267: 502–514.
49. Sportès, C., F. T. Hakim, S. A. Memon, H. Zhang, K. S. Chua, M. R. Brown, T. A. Fleisher, M. C. Krumlauf, R. R. Babb, C. K. Chow, et al. 2008. Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J. Exp. Med.* 205: 1701–1714.
50. Levy, Y., C. Lacabartz, L. Weiss, J. P. Viard, C. Goujard, J. D. Lelièvre, F. Boué, J. M. Molina, C. Rouzioux, V. Avettand-Fénoël, et al. 2009. Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J. Clin. Invest.* 119: 997–1007.
51. Mackall, C. L., T. J. Fry, and R. E. Gress. 2011. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 330–342.
52. Rosenberg, S. A., C. Sportès, M. Ahmadzadeh, T. J. Fry, L. T. Ngo, S. L. Schwarz, M. Stetler-Stevenson, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, M. Morre, et al. 2006. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J. Immunother.* 29: 313–319.
53. Pellegrini, M., T. Calzascia, J. G. Toe, S. P. Preston, A. E. Lin, A. R. Elford, A. Shahinian, P. A. Lang, K. S. Lang, M. Morre, et al. 2011. IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology. *Cell* 144: 601–613.
54. Pellegrini, M., T. Calzascia, A. R. Elford, A. Shahinian, A. E. Lin, D. Dissanayake, S. Dhanji, L. T. Nguyen, M. A. Gronski, M. Morre, et al. 2009. Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies. *Nat. Med.* 15: 528–536.
55. Dean, R. M., T. Fry, C. Mackall, S. M. Steinberg, F. Hakim, D. Fowler, J. Odom, J. Foley, R. Gress, and M. R. Bishop. 2008. Association of serum interleukin-7 levels with the development of acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Oncol.* 26: 5735–5741.
56. Tomita, T., T. Kanai, Y. Nemoto, T. Totsuka, R. Okamoto, K. Tsuchiya, N. Sakamoto, and M. Watanabe. 2008. Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. *J. Immunol.* 180: 383–390.
57. Tomita, T., T. Kanai, T. Totsuka, Y. Nemoto, R. Okamoto, K. Tsuchiya, N. Sakamoto, T. Ohteki, T. Hibi, and M. Watanabe. 2009. IL-7 is essential for lymphopenia-driven turnover of colitogenic CD4(+) memory T cells in chronic colitis. *Eur. J. Immunol.* 39: 2737–2747.
58. Ponchel, F., R. J. Cuthbert, and V. Göb. 2011. IL-7 and lymphopenia. *Clin. Chim. Acta* 412: 7–16.

Article 4:

Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells.

Nat Commun 2013;4:2209

Bruno Martin*, Cédric Auffray*, Arnaud Delpoux, Arnaud Pommier, Aurélie Durand, Céline Charvet, Philippe Yakonowsky, Hubert de Boysson, Nelly Bonilla, Alexandra Audemard, Tim Sparwasser, Benoît L. Salomon, Bernard Malissen, Bruno Lucas .

Lors de l'activation, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs se différencient en de multiplient types de lymphocytes CD4⁺ auxiliaires caractérisés par leur production de cytokines. À l'heure actuelle, il est considéré que l'engagement vers un lignage donné est majoritairement dépendant des conditions environnementales dans lesquelles les lymphocytes T CD4⁺ naïfs se trouvent. Nous mettons en question ici ce modèle basé sur la supposée homogénéité du compartiment des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Tout d'abord, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs peuvent être subdivisés en deux sous-populations en fonction de leur expression de Ly-6C. De plus, ces deux sous-populations ne sont pas intrinsèquement capables de se différencier de la même façon en lymphocytes T CD4⁺ régulateurs induits. Enfin, l'analyse phénotypique et les expériences de transfert adoptif révèlent que l'expression de Ly-6C est dépendante de la reconnaissance du soi, définissant Ly-6C comme un nouveau marqueur de la réactivité au soi des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. L'ensemble de nos résultats montrent que les lymphocytes T CD4⁺ naïfs ayant la plus forte avidité pour le soi sont enclins à se différencier en lymphocytes T CD4⁺ régulateurs induits

ARTICLE

Received 7 Mar 2013 | Accepted 26 Jun 2013 | Published 31 Jul 2013

DOI: 10.1038/ncomms3209

Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells

Bruno Martin^{1,2,3,*}, Cédric Auffray^{1,2,3,*}, Arnaud Delpoux^{1,2,3}, Arnaud Pommier^{1,2,3}, Aurélie Durand^{1,2,3}, Céline Charvet^{1,2,3}, Philippe Yakonowsky^{1,2,3}, Hubert de Boysson^{1,2,3}, Nelly Bonilla^{1,2,3}, Alexandra Audemard^{1,2,3}, Tim Sparwasser⁴, Benoit L. Salomon^{5,6,7}, Bernard Malissen^{8,9,10} & Bruno Lucas^{1,2,3}

Upon activation, naive CD4 T cells differentiate into a variety of T-helper-cell subsets characterized by different cytokine production and functions. Currently, lineage commitment is considered to depend mostly on the environmental context to which naive CD4 T cells are exposed. Here we challenge this model based on the supposed homogeneity of the naive CD4 T-cell compartment. We show that peripheral naive CD4 T cells can be subdivided into two subsets according to Ly-6C expression. Furthermore, the two newly defined subsets (Ly-6C[−] and Ly-6C⁺ naive CD4 T cells) are not equal in their intrinsic ability to commit into the induced regulatory T-cell lineage. Finally, phenotypic analysis, imaging and adoptive transfer experiments reveal that Ly-6C expression is modulated by self-recognition, allowing the dichotomization of the naive CD4 T-cell compartment into two cell subsets with distinct self-reactivity. Altogether, our results show that naive CD4 T cells with the highest avidity for self are prone to differentiate into regulatory T cells.

¹CNRS UMR8104, Cochin Hospital, 75014 Paris, France. ²INSERM U1016, Cochin Hospital, 75014 Paris, France. ³Paris Descartes University, Cochin Hospital, 75014 Paris, France. ⁴Institute of Infection Immunology, TWINCORE Center of Experimental and Clinical Infection Research, 30625 Hannover, Germany. ⁵CNRS UMR7211, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France. ⁶INSERM U959, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France. ⁷Paris Sorbonne University, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France. ⁸CNRS UMR6102, Aix-Marseille Université UM 631, 5 Campus de Luminy case 906, 13288 Marseille, France. ⁹INSERM U631, Aix-Marseille Université UM 631, 5 Campus de Luminy case 906, 13288 Marseille, France. ¹⁰Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille Université UM 631, 5 Campus de Luminy case 906, 13288 Marseille, France. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to B.L. (email: bruno.lucas@inserm.fr).

In normal young adult mice, the peripheral CD4 T-cell compartment is composed of almost 80% naive T cells. The remaining 20% are distributed between regulatory and effector/memory-phenotype CD4 T cells. Following activation by antigen-presenting cells (APCs) in the periphery, naive CD4 T (CD4 T_N) cells can differentiate into a variety of well-documented T-helper (T_H) cell subsets, such as T_H1, T_H2, T_H17 or induced regulatory T (iTreg) cells, characterized by their cytokine-production profiles and specific effector functions. For instance, T_H1 cells are characterized by their production of interferon (IFN)- γ , a potent activator of cell-mediated immunity^{1,2}. T_H2 cells are characterized by production of interleukin (IL)-4, IL-5 and IL-13, which are potent activators of B-cell immunoglobulin production^{1,2}. In addition, T_H17 cells are characterized by IL-17A, IL-17F and IL-22 secretion and are described to have an important role in anti-microbial responses^{3,4}. Finally, iTreg cells produce transforming growth factor- β (TGF- β) and share phenotypic and functional characteristics with natural regulatory T cells that have a crucial role in maintaining peripheral self-tolerance⁵. Identification of T-bet, GATA-3, ROR γ t/ROR α and Foxp3 as lineage-defining transcription factors solidified the categorization into T_H1, T_H2, T_H17 and iTreg effector cell subsets^{6–10}. Additional T_H cell subsets have also been described, such as IL-10 producing type 1 regulatory T cells¹¹, IL-9 producing T_H9 cells¹² or T_{FH} cells¹³.

Lineage commitment leads to a broad diversity of effector cell functions and is considered to depend mostly on the immunological context in which CD4 T_N cells are immersed at the time of their activation. Indeed, the differentiation fate appears predominantly governed by extrinsic factors such as cytokines or environmental cues. Specifically, *in vitro* culture assays and *in vivo* models have been used to establish that IL-12, IL-4, TGF- β alone or TGF- β in combination with pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, are crucially required for T_H1, T_H2, iTreg or T_H17-cell differentiation, respectively^{14–18}. This commonly accepted model implicitly posits that the CD4 T_N cells on which the various cytokines act constitute an homogeneous population of cells. However, intrinsic heterogeneity within the CD4 T_N-cell pool such as TCR affinity for antigen or sensitivity to co-stimulatory signals and cytokines should be taken into account when considering, *in vivo*, CD4 T_N-cell differentiation¹⁹.

In light of these considerations, we decided to study whether intrinsic properties of CD4 T_N cells, in association with the cytokine environment in which they are immersed, could contribute to helper CD4 T-cell commitment. Here we show that peripheral CD4 T_N cells can be subdivided into two subsets according to Ly-6C expression. These two newly defined subsets are not equal in their intrinsic ability to commit into the iTreg-cell lineage with Ly-6C[–] CD4 T_N cells differentiating more efficiently into iTreg cells than their Ly-6C⁺-cell counterparts both *in vivo* and *in vitro*.

Results

Heterogeneity of Ly-6C expression in CD4 T_N cells. Throughout this study, CD4 T_N lymphocytes were defined as Foxp3[–] CD25[–] CD44^{–/lo} CD4⁺ CD8 α [–] TCR β ⁺ cells (Supplementary Fig. S1a). Although the CD4 T_N-cell compartment is commonly considered as homogenous, we observed, as previously described^{20,21}, that CD4 T_N cells from the secondary lymphoid organs of C57BL/6 mice (peripheral lymph node (pLN) and mesenteric lymph node (mLN) and spleen) can be subdivided into two subsets according to Ly-6C expression (Fig. 1a,b). This applied also to CD4 T_N cells from bone marrow (BM), Peyer's patches, blood and peritoneal cavity. Although the proportion of CD4

T_N cells varied greatly between these organs, in all of them, about two-thirds of CD4 T_N cells expressed Ly-6C (Supplementary Fig. S1b). In contrast, Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were almost completely absent in the thymus.

Both Ly-6C[–] and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from pLNs exhibited a true naive phenotype illustrated by their high expression of CD45RB, CD62L and CD127 and their lack of expression of CD69 (Fig. 1c). Consistent with their naive phenotype, both T_N-cell subsets were not able to produce IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 or IFN- γ in response to stimulation (Fig. 1d). By contrast, memory-phenotype CD4 T cells (CD4 T_{mem} cells) produced all of these cytokines and, as expected, regulatory CD4 T cells (CD4 Treg cells) synthesized IL-10. Finally, we observed that a similar proportion of Ly-6C[–] and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells produced TNF- α . Therefore, Ly-6C expression divides the peripheral CD4 T_N-cell compartment into two subsets.

Pathogenicity of Ly-6C[–] and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells. To test whether the phenotypic heterogeneity of the CD4 T_N-cell compartment might reveal differential expansion/differentiation potentials, highly purified Ly-6C[–] or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were transferred into T-cell-deficient recipients (Fig. 2a, Supplementary Fig. S2). T-cell compromised animals injected with CD4 T_N cells are known to rapidly develop inflammatory bowel disease (IBD)^{22,23}. Interestingly, mice injected with Ly-6C[–] CD4 T_N cells developed with time a more severe wasting disease than those injected with Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (Fig. 2b). This correlated with higher histological colitis scores (determined 7 weeks after transfer by examination of colon sections) when mice were injected with Ly-6C[–] CD4 T_N cells (Fig. 2c). Surprisingly, contrasting with clinical observations, Ly-6C[–] CD4 T_N cells expanded to a lesser extent than their Ly-6C⁺-cell counterparts when transferred into T-cell-deficient recipients (Fig. 2d). Differences were not only quantitative as, in all studied secondary lymphoid organs, Ly-6C[–] CD4 T_N cells gave rise to greater proportions and absolute numbers of iTreg cells as compared with Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (Fig. 2e, Supplementary Fig. S3). In addition, although Ly-6C⁺ CD4 T_N-cell transfer led to higher proportions and absolute numbers of IFN γ -producing CD4 T cells in secondary lymphoid organs, the differentiation of Ly-6C[–] CD4 T_N cells resulted in greater proportions and absolute numbers of newly generated IL-17⁺ CD4 T cells (Fig. 2f, Supplementary Fig. S3). Interestingly, the proportion of IL-17⁺ CD4 T cells was tightly correlated with the proportion of newly generated iTreg cells (Fig. 2g). These latter results suggest that, in the IBD experimental model, iTreg-cell generation promotes T_H17 CD4 T-cell development as recently suggested in other settings^{24,25}.

iTreg cells promote T_H17 differentiation in an IBD model. We then performed co-transfer experiments in which Ly-6C[–] CD4 T_N cells from CD45.2 mice were co-injected with Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from CD45.1 mice into T-cell-deficient recipients (Fig. 3a). T-cell-deficient mice injected with Ly-6C[–] or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells alone were used in parallel as control mice (Supplementary Fig. S4a).

Mice co-injected with both Ly-6C[–] and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells developed a wasting disease and colitis as severe as mice injected with Ly-6C[–] CD4 T_N cells alone (Supplementary Fig. S4b,c). When both cell subsets were injected together, Ly-6C[–] CD4 T_N cells still gave rise to a higher proportion of newly differentiated iTreg cells than their Ly-6C⁺-cell counterparts (Fig. 3b). By contrast, in all secondary lymphoid organs studied, neither expansion nor T_H17/T_H1 differentiation appeared significantly different between both transferred cell subsets (Fig. 3b,c). More precisely, when injected together, Ly-6C[–] and Ly-6C⁺ CD4

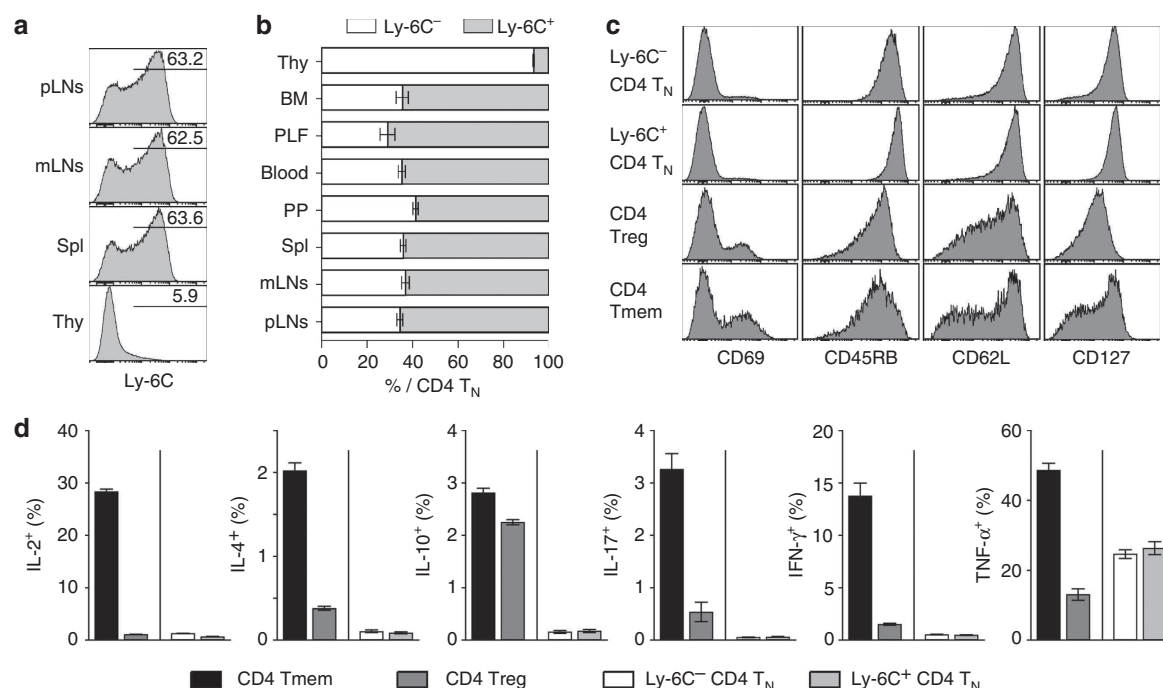


Figure 1 | CD4 T_N cells can be subdivided into two subsets on the basis of Ly-6C molecule expression. (a) Ly-6C fluorescence histograms of CD4 T_N cells (CD4⁺ CD8α⁻ TCRβ⁺ Foxp3⁻ CD25⁻ CD44^{hi} T cells) recovered from pLNs, mLNs, spleen (Spl) and thymus (Thy) are shown for a representative C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. Numbers in each histogram represent the percentage of Ly-6C⁺ cells among CD4 T_N cells. (b) The proportions of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ cells among CD4 T_N cells recovered from the thymus, BM, peritoneal lavage fluid (PLF), blood, Peyer's patches (PP), spleen, mLNs and pLNs of C57BL/6 mice were calculated. Results are shown as means ± s.e.m. for six mice from two independent experiments. (c) CD69, CD45RB, CD62L and CD127 fluorescence histograms of pLN Ly-6C⁻ CD4 T_N cells, Ly-6C⁺ CD4 T_N cells, regulatory CD4 T cells (CD4 Treg defined as Foxp3⁺ CD4⁺ CD8α⁻ TCRβ⁺) and memory CD4 T cells (CD4 Tmem defined as Foxp3⁻ CD44^{hi} CD4⁺ CD8α⁻ TCRβ⁺ cells) are shown for a representative C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. The histograms are representative of at least six mice from three individual experiments. (d) The proportions of IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN-γ or TNF-α producing cells among memory, regulatory, Ly-6C⁻ and naive Ly-6C⁺ CD4 T_N cells recovered from pLNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice were estimated after a pulse stimulation with phorbol myristate acetate and ionomycin. Results are shown as means ± s.e.m. for six mice from two independent experiments.

T_N cells gave rise to proportions of IL-17⁺ among CD4 T cells similar to those observed when Ly-6C⁻ CD4 T_N cells were injected alone (Supplementary Fig. S5). We then analysed, in this setting, the correlations between the ability of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells to differentiate into iTreg cells and the capacity of co-injected Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells to give rise to IL-17-producing CD4 T cells (Supplementary Fig. S6). Interestingly, the proportion of IL-17-producing CD4 T cells arising from initially injected Ly-6C⁻ (CD45.2) and Ly-6C⁺ (CD45.1) CD4 T_N cells similarly correlated with the percentage of iTreg cells generated from CD45.2⁺ Ly-6C⁻ CD4 T_N cells. These results agreed with our hypothesis that newly differentiated iTreg cells would favour T_H17-cell differentiation. Finally, we conducted iTreg-cell-depletion experiments. Ly-6C⁻ CD4 T_N cells from DERE mice²⁶ were injected into T-cell-deficient recipients treated or not with diphtheria toxin (DT) twice a week (Fig. 3d). As expected, DT efficiently depleted iTreg cells (Supplementary Fig. S7a,b). More interestingly, DT treatment resulted in the reduction of the severity of the wasting disease (Fig. 3e) correlated with a significant decrease of the histological colitis score (Supplementary Fig. S7c). Depletion of iTreg cells also led to a strong inhibition of T_H17-cell development (Fig. 3f). Taken together, our data strongly suggest that, in our experimental model, iTreg-cell differentiation promotes T_H17-cell generation.

Efficient Ly-6C⁻ CD4 T_N-cell polarization into iTreg cells.

Ly-6C⁻ CD4 T_N cells were more efficient in differentiating into

iTreg cells than Ly-6C⁺ CD4 T_N cells *in vivo* when transferred into a lymphopenic environment. To further assess whether this characteristic feature was an intrinsic property of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells, we performed iTreg-cell polarization assays *in vitro*. Purified Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were stimulated with anti-CD3- and anti-CD28-coated antibodies (Abs) in the presence of graded doses of TGFβ. Although they expressed similar amounts of the TGFβ receptors I and II (Supplementary Fig. S8), Ly-6C⁻ CD4 T_N cells gave rise to a twofold higher proportion of iTreg cells than Ly-6C⁺ CD4 T_N cells did for suboptimal doses of exogenous TGFβ (Fig. 4a). Differences were quantitative rather than qualitative, as iTreg cells generated from both Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells displayed similar suppressive capacities (Fig. 4b). Two groups have recently described that suboptimal activation of CD4 T_N cells in the absence of exogenous TGFβ led to their conversion into iTreg cells^{27,28}. In this setting, a more efficient conversion was also observed in Ly-6C⁻ CD4 T_N-cell cultures (Supplementary Fig. S9).

We then compared the capacity of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells to polarize into T_H1 and T_H17 cells *in vitro* (Fig. 4c,d). In response to low doses of TGFβ in the presence of IL-6, Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells gave rise to similar proportions of T_H17 cells. However, for high doses of TGFβ, Ly-6C⁻ CD4 T_N cells differentiated less efficiently into T_H17 cells than their Ly-6C⁺-cell counterparts (Fig. 4c). This decreased ability of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells to generate T_H17 cells in response to high doses of TGFβ may derive from the fact that part of them differentiated into iTreg cells in these conditions despite the

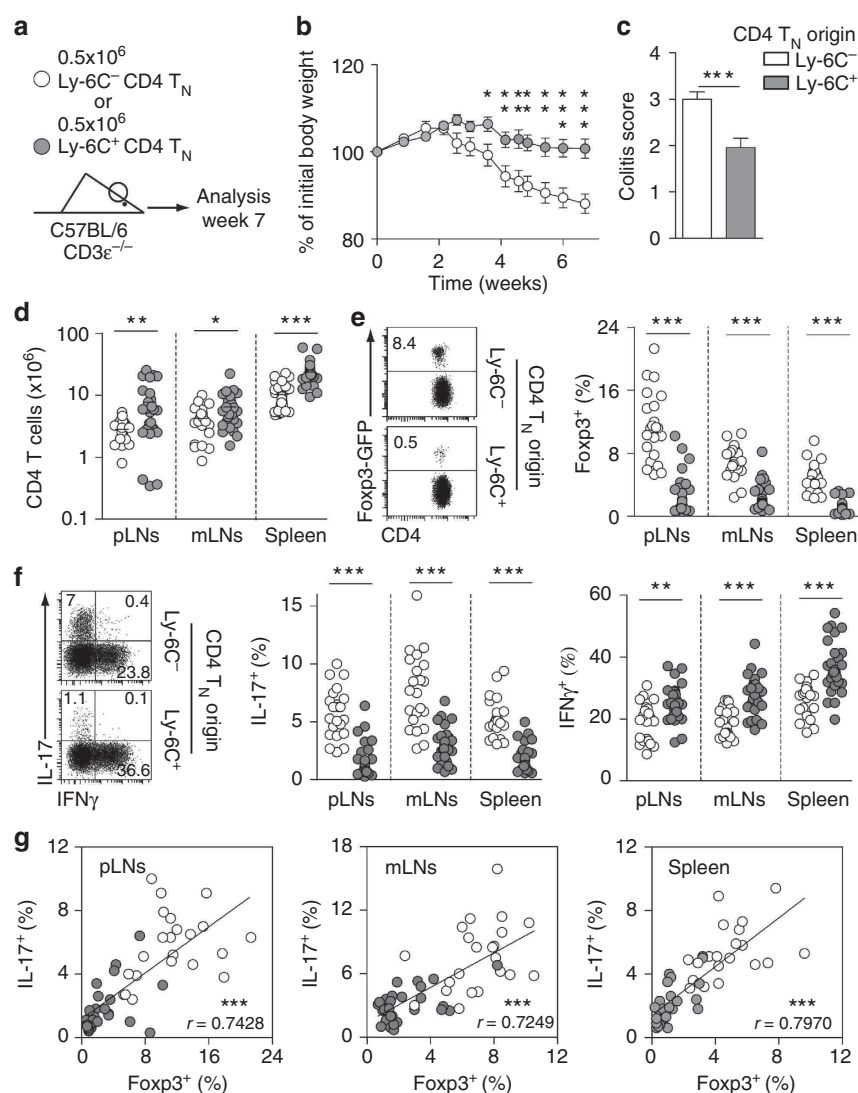


Figure 2 | Differential pathogenicity of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells after transfer into T-cell-deficient recipients. 0.5×10^6 flow-cytometry-sorted Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 FcγR3-GFP mice were injected intravenously into C57BL/6 CD3ε^{-/-} mice. Seven weeks after transfer, pLNs, mLN and spleen were recovered separately. **(a)** Diagram illustrating the experimental model. **(b)** Body weight of recipient mice was monitored up to 7 weeks post transfer, and percentages of initial body weight were calculated and plotted. **(c)** Colitis scores of recipient mice were assessed 7 weeks after transfer. **(d)** Absolute numbers of CD4 T cells recovered from pLNs, mLN and spleen of recipient mice. **(e)** FcγR3-GFP/CD4 dot-plots for gated CD4⁺ CD8α⁻ CD3⁺ T cells recovered from pLNs of representative recipient mice and proportion of FcγR3⁺ cells among CD4⁺ CD8α⁻ CD3⁺ T cells recovered from pLNs, mLN and spleen of recipient mice. **(f)** IL-17/IFNγ dot-plots for gated CD4⁺ CD8α⁻ CD3⁺ T cells recovered from pLNs of representative recipient mice and proportion of IL-17- and IFNγ-producing CD4⁺ CD8α⁻ CD3⁺ T cells recovered from pLNs, mLN and spleen of recipient mice. **(g)** Correlation between the proportion of FcγR3-expressing and IL-17-producing cells among CD4⁺ CD8α⁻ CD3⁺ T cells recovered from pLNs, mLN and spleen of recipient mice. **(b–c)** Results are shown as means \pm s.e.m. for at least six mice per group per experiment, from four independent experiments. **(d–g)** Each dot represents an individual mouse. **(b–f)** Significance of differences between two series of results was assessed using a two-tailed unpaired Student's *t*-test. **(g)** Correlation analyses were performed using Pearson's correlation test. Values of $P < 0.05$ were considered as statistically significant (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; and *** $P < 0.001$).

presence of IL-6. CD4 T_N-cell polarization into T_H1 cells did not differ whether or not cells were initially expressing Ly-6C (Fig. 4d). Taken together, our data strongly suggest that Ly-6C⁻ CD4 T_N cells have an intrinsic higher capacity to differentiate into iTreg cells than their Ly-6C⁺-cell counterparts, whereas both subsets differentiate with a similar efficiency into T_H1 and T_H17 cells.

Ly-6C expression is acquired in the periphery. We then decided to determine where and when Ly-6C expression was acquired by CD4 T_N cells. To follow thymic output and specifically identify

recent thymic emigrants in secondary lymphoid organs, we used recombination-activating gene 2 promoter (RAG2p)-green fluorescent protein (GFP) transgenic mice, in which GFP expression is driven by the RAG2p. The transgene generates a bright GFP signal during thymic differentiation that remains detectable in the periphery throughout the first few days after their migration²⁹. Although most CD4 T_N single-positive thymocytes were Ly-6C⁻, about 40% of CD4 T_N recent thymic emigrants (GFP^{hi}) in LNs already expressed Ly-6C molecule, suggesting that the acquisition of Ly-6C expression by CD4 T_N cells occurs very rapidly after their exit from the thymus (Fig. 5a).

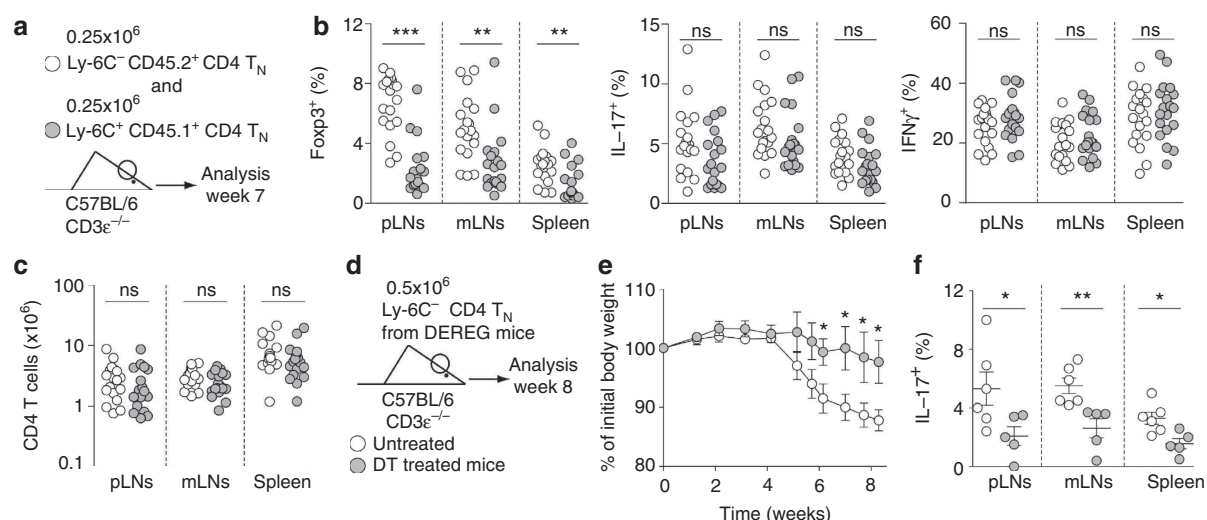


Figure 3 | Newly generated iTreg cells promote TH17-cell differentiation after CD4 TH-cell transfer into T-cell-deficient recipients. (a–c) Ly-6C⁻ CD4 T_N cells (0.25 × 10⁶) from C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice were injected intravenously (i.v.) into C57BL/6 CD3ε^{-/-} mice together with 0.25 × 10⁶ Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice. Seven weeks after transfer, pLNs, mLNs and spleen were recovered separately and analysed. (a) Diagram illustrating the experimental model. (b) Proportions of CD45.1⁺ or CD45.2⁺ CD4 T cells expressing Foxp3 or producing IL-17 or IFNγ recovered from pLNs, mLNs and spleen of recipient mice. (c) Absolute numbers of CD45.1⁺ or CD45.2⁺ CD4 T cells recovered from pLNs, mLNs and spleen of recipient mice. (d–f) Ly-6C⁻ CD4 T_N cells (0.5 × 10⁶) from DERE mice were injected i.v. into C57BL/6 CD3ε^{-/-} mice treated or not twice a week with DT. (d) Diagram illustrating the experimental model. (e) Body weight of recipient mice was monitored up to 8 weeks post transfer, and percentages of initial body weight were calculated and plotted. (f) Proportions of IL-17-producing CD4⁺ CD8α⁻ CD3⁺ T cells recovered from pLNs, mLNs and spleen of recipient mice. (b,c,f) Each dot represents an individual mouse. (e,f) Results are shown as means ± s.e.m. for two independent experiments. Significance of differences between two series of results was assessed using a two-tailed paired (b,c) or unpaired (e,f) Student's *t*-test. Values of *P* < 0.05 were considered as statistically significant (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; and ****P* < 0.001). ns, not significant.

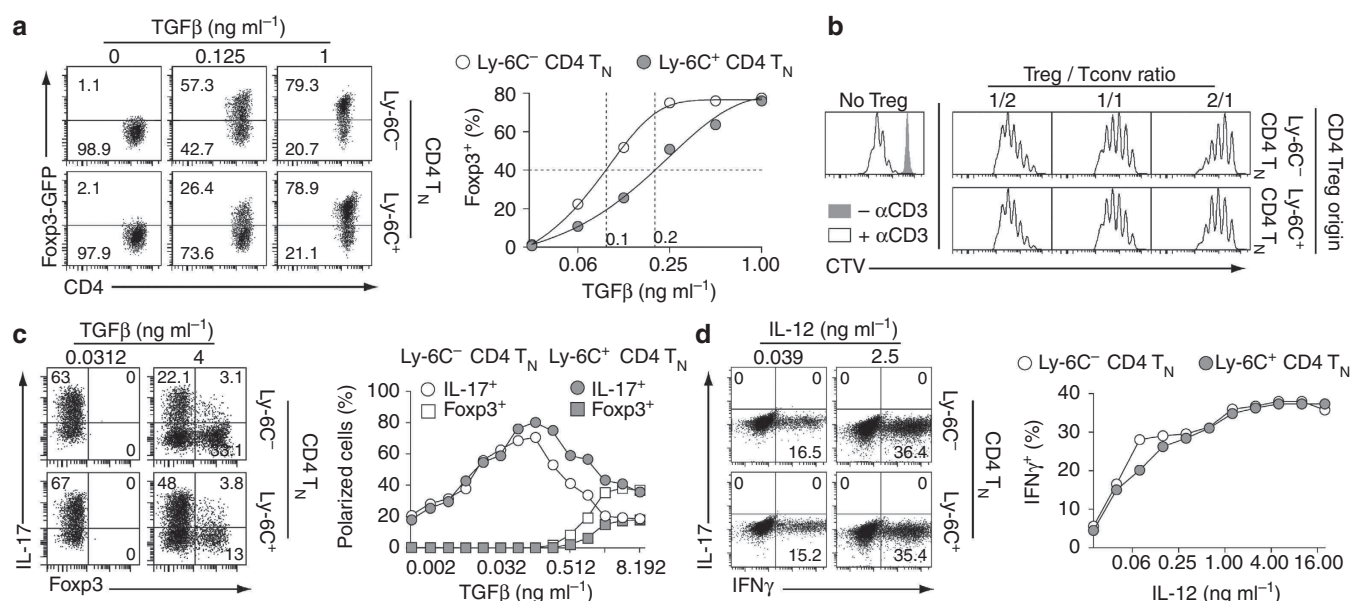


Figure 4 | Ly-6C⁻ CD4 TH cells differentiate more efficiently into iTreg cells than Ly-6C⁺ CD4 TH cells *in vitro*. (a) Purified LN Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice were stimulated for 4 days with coated anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence of graded concentrations of TGFβ1. Representative Foxp3-GFP/CD4 dot-plots for gated CD4 T cells and the proportion of Foxp3⁺ cells among CD4 T cells are shown as a function of TGFβ1 concentration. (b) Purified Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were stimulated for 3 days with coated anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence of 1 ng ml⁻¹ of TGFβ1 and then let to rest for 3 more days in the presence of IL-2 (13 ng ml⁻¹). GFP-expressing cells were then sorted using flow cytometry, and their suppressive abilities to inhibit the proliferation of Cell Trace Violet-labelled conventional CD4 T cells (LN GFP⁻ CD4 T cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice) in response to anti-CD3 Abs in the presence of APCs were tested. (c) Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice were stimulated for 4 days with coated anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence of IL-6 (20 ng ml⁻¹) and graded concentrations of TGFβ1. Representative IL-17/Foxp3 dot-plots for gated CD4 T cells, the proportion of IL-17-producing CD4 T cells and the proportion of Foxp3⁺ cells among CD4 T cells are shown as a function of TGFβ1 concentration. (d) Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice were stimulated for 4 days with coated anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence of graded concentrations of IL-12. Representative IL-17/IFNγ dot-plots for gated CD4 T cells and the proportion of IFNγ⁺-producing CD4 T cells are shown as a function of IL-12 concentration. Results are representative of at least three independent experiments.

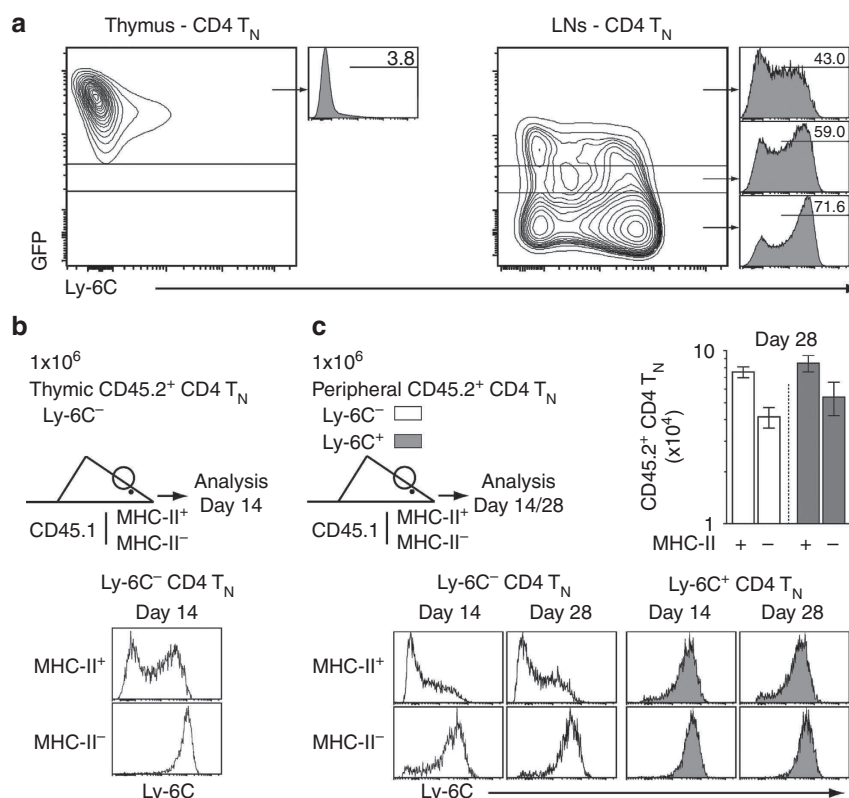


Figure 5 | Ontogeny of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells. (a) GFP/Ly-6C contour plots and Ly-6C fluorescence histograms of gated CD4 T_N cells recovered from the thymus and LNs of a representative C57BL/6 RAG2p-GFP reporter mouse. Numbers in each histogram represent the percentage of Ly-6C⁺ cells among the indicated CD4 T_N cell subsets. (b) 1 × 10⁶ thymic Ly-6C⁻ CD4 T_N cells from C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice were injected intravenously (i.v.) into C57BL/6 CD45.1 mice lacking (MHC-II⁻) or not lacking (MHC-II⁺) MHC class II molecule expression. A diagram illustrating the experimental model and Ly-6C fluorescence histograms of gated CD45.2⁺ CD4 T_N cells recovered from LNs of recipient mice 14 days after transfer are shown. (c) Ly-6C⁻ (1 × 10⁶) or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice were injected i.v. into CD45.1 C57BL/6 mice lacking or not lacking MHC class II molecule expression. A diagram illustrating the experimental model is shown. The absolute numbers of CD45.2⁺ CD4 T_N cells recovered from the periphery (LNs + spleen) of recipient mice 28 days after transfer are shown as means ± s.e.m. Ly-6C fluorescence histograms of CD45.2⁺ CD4 T_N cells recovered from LNs of recipient mice 14 and 28 days after transfer are shown. Results are representative of at least two independent experiments.

Furthermore, the proportion of Ly-6C⁺ cells among peripheral CD4 T_N lymphocytes increased with GFP brightness decay, indicating that acquisition of Ly-6C expression occurred in a rapid and gradual manner over time.

Then, we injected Ly-6C⁻ CD4 T_N single-positive thymocytes from CD45.2 mice into CD45.1 mice expressing or lacking major histocompatibility complex (MHC) class II molecules (Fig. 5b). As expected, Ly-6C⁻ CD4 T_N single-positive thymocytes gave rise to both Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells after transfer into MHC class II-competent recipients. More surprisingly, all CD45.2⁺ CD4 T_N cells recovered from MHC class II-deficient recipients were expressing Ly-6C, suggesting that all CD4 T_N cells acquired Ly-6C expression or that survival of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells was highly compromised in this context.

To address these issues, peripheral Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from CD45.2 mice were transferred into CD45.1 mice expressing or lacking MHC class II molecules (Fig. 5c). The survival of both Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD45.2⁺ CD4 T_N-cell subsets was affected by MHC class II molecule deprivation, excluding the hypothesis of a preferential disappearance of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells in MHC class II-deficient recipients. Ly-6C expression by CD45.2⁺ CD4 T_N cells was also assessed. First, we noticed that Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ phenotypes were rather stable over time after transfer into MHC class II-competent recipients. One can notice that some CD4 T_N cells, initially

Ly-6C⁻, expressed low levels of this marker 14 days after transfer. However, this percentage remained relatively stable thereafter (33.1 ± 2.1 on day 14 versus 37.3 ± 1.9 on day 28, not significant). By contrast, virtually all peripheral CD45.2⁺ CD4 T_N cells recovered from MHC class II-deficient recipients expressed Ly-6C whether or not they were expressing it before transfer. One may argue that MHC class II-deficient recipients lack not only MHC class II molecule expression but also endogenous CD4 T cells and that this latter point introduces another element of variability between both types of recipients. To address this issue, we generated BM chimeras in which CD4 T cells were produced in the thymus but were unable to interact with MHC class II molecules in the periphery (Supplementary Fig. S10a (refs 30,31)). Although such chimeras contained as many peripheral CD4 T cells as control chimeras 4 weeks after BM cell transfer, almost all their CD4 T_N cells were expressing Ly-6C in the periphery (Supplementary Fig. S10b, c). Altogether, these results suggest that the down-modulation of Ly-6C expression by CD4 T_N cells is dependent on continuous interactions with MHC class II molecules.

Ly-6C expression is modulated by self-recognition. In line with a role for TCR signalling in the modulation of Ly-6C expression in CD4 T_N cells, we found that *in vitro* Ly-6C⁺ CD4 T_N-cell activation in response to TCR stimulation led to Ly-6C

downregulation (Supplementary Fig. S11). Injection of CD4 T_N cells into lymphopenic recipients (such as in the IBD model) led to the activation, the strong proliferation and the conversion into memory-like cells of part of the injected cells in response to self and environmental antigens, a process known as spontaneous proliferation^{32,33}. This CD4 T-cell spontaneous proliferation relied on interactions with MHC class II molecules, and 2 weeks after transfer, most CD4 T cells recovered from the periphery of recipient mice derived from this process. Interestingly, the progeny of both Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells was lacking Ly-6C expression 2 weeks after transfer into lymphopenic recipients (Supplementary Fig. S12). Thus, the TCR signals leading to T-cell activation induced Ly-6C downregulation both *in vitro* and *in vivo*.

We hypothesized that Ly-6C surface levels on CD4 T_N cells might predict their propensity to interact with peripheral self-MHC class II molecules and thus to receive subthreshold TCR signals. CD5 expression on CD4 T_N cells has been shown to be adjusted to reflect TCR contact with self^{34–37}. In fact, the more a CD4 T_N cell interacts with self, the more this cell expresses CD5. We thus analysed the expression of CD5, but also of CD4 and of the TCR itself by peripheral Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells. Consistent with our hypothesis, we observed that Ly-6C⁻ CD4 T_N cells exhibited significantly higher densities of CD5 and lower levels of the TCR β chain and CD4 compared with their Ly-6C⁺-cell counterparts (Fig. 6a). Mandl *et al.*³⁷ have recently shown that the more CD4 T_N cells expressed CD5, the more the ζ -chain of the CD3 complex was phosphorylated. In line with a higher capacity of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells to interact with self, we found that the extent of CD3 ζ phosphorylation was far more important in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells than in Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (p ζ / ζ ratio, Fig. 6b and Supplementary Fig. S11).

We then decided to image Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells. Stefanova *et al.*³⁸ have shown that recognition of self-ligands by CD4 T_N cells induced the clustering of the TCR complex and associated signalling molecules to the region of the lymphocyte membrane in contact with APCs. Here we found that LN CD4 T_N cells directly fixed after isolation exhibited various degrees of clustering of both the CD4 co-receptor and ZAP-70 (Fig. 6c). We quantified CD4 polarization and found that the CD4 polarization index was significantly greater in Ly-6C⁻ CD4 T_N cells than in Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (Fig. 6d). More precisely, Ly-6C⁻ CD4 T_N cells contained a higher proportion of cells exhibiting high degree of CD4 polarization than their Ly-6C⁺-cell counterparts (Fig. 6e). Thus, at one given time, a higher proportion of Ly-6C⁻ than Ly-6C⁺ CD4 T_N cells might be interacting with APCs in LNs.

A greater ability of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells to interact with self-MHC class II molecules should have consequences on their behaviour in secondary lymphoid organs. Mandl *et al.*³⁶ have recently shown that interactions with MHC class II molecules retained CD4 T_N cells in LNs. By using the same protocol (Fig. 6f), we analysed the phenotype of CD4 T_N cells remaining within LNs after entry blockade. Most CD4 T cells have egressed from LNs 21 h after entry blockade (Fig. 6g). Interestingly, Ly-6C⁻ cells were greatly enriched in the remaining CD4 T_N cells (Fig. 6h). We then verified that retention of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells in LNs after entry blockade was due to interactions with MHC class II molecules. To do so, we injected CD45.2⁺ T cells into CD45.1 recipients lacking (MHC-II⁻) or expressing (MHC-II⁺) MHC class II molecules. Two hours later, LN entry was blocked and LNs were collected 21 h after entry blockade (Fig. 6i). Although the absolute numbers of remaining Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were unaffected by MHC class II deprivation, those of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells were significantly decreased in recipients lacking MHC class II molecules (Fig. 6j). This was not due to the

acquisition of Ly-6C expression by Ly-6C⁻ CD4 T_N cells, as 24 h were not sufficient to induce upregulation of this marker (Supplementary Fig. S13). Thus, interactions with MHC class II molecules only retained Ly-6C⁻ CD4 T_N cells within LNs. These last results are in line with the greater average polarization of CD4 and ZAP-70 molecules at the cell surface of Ly-6C⁻ CD4 T_N cells and suggest that Ly-6C⁻ CD4 T_N cells are interacting more strongly than Ly-6C⁺ CD4 T_N cells with MHC class II-expressing cells in peripheral secondary lymphoid organs.

Self-recognition reinforces iTreg-cell differentiation. We then determined whether self-recognition might have a role in the differential ability of Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells to differentiate into iTreg cells. First, we studied the expression of CD5 and Ly-6C by peripheral monoclonal CD4 T_N cells from AND and Marylin TCR-transgenic mice in a RAG2^{-/-} background. It has recently been shown that AND CD4 T cells have a higher avidity for self than Marylin CD4 T cells^{37,39,40}. Indeed, AND CD4 T cells expressed far higher density of CD5 than Marylin CD4 T cells (Fig. 7a (ref. 37)). In agreement with our assumption that Ly-6C non-expression might reflect the magnitude of CD4 T_N-cell self-reactivity, all Marylin CD4 T cells were expressing high surface amounts of Ly-6C, whereas the majority of AND CD4 T cells did not (Fig. 7a). Finally, in line with our experiments with polyclonal CD4 T_N cells, we observed that AND CD4 T cells differentiated far more efficiently than Marylin CD4 T cells into iTreg cells *in vitro* (Fig. 7b).

Second, we adoptively transferred Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from CD45.2 mice into CD45.1 recipients expressing or lacking MHC class II molecules (Fig. 7c). Three weeks after transfer, CD45.2⁺ CD4 T_N cells were purified from the periphery of recipient mice and assessed for their ability to differentiate into iTreg cells *in vitro*. For suboptimal doses of TGF β , cells purified from MHC-II-competent recipients initially injected with Ly-6C⁻ CD4 T_N cells gave rise to a twofold higher proportion of iTreg cells than cells derived from MHC class II-deficient recipients initially injected with the same cells or from MHC-II-competent recipients initially injected with Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (Fig. 7d,e). Altogether, our data strongly suggest that the ability of a naive T cell to commit into the iTreg-cell lineage pathway upon *in vitro* stimulation is shaped by its capacity to interact with self in its original environment.

Discussion

Over the last decades, the CD4 T_N cells have been commonly considered as a homogenous T-cell compartment. In the present paper, we confirm that Ly-6C expression splits this compartment into positive and negative cells with one-third of peripheral CD4 T cells lacking this marker^{20,21}. Expression of Ly-6C is acquired in the periphery as almost all thymocytes are Ly-6C⁻. More precisely, analysis of RAG2p-GFP mice and adoptive transfer experiments indicate that thymocytes rapidly gain Ly-6C expression upon migration to the periphery. Then, the expression of Ly-6C by peripheral CD4 T_N cells is stable over time. Moreover, several lines of evidence strongly suggest that the expression of Ly-6C by peripheral CD4 T_N cells inversely correlates with their ability to interact with self. First, all thymic and peripheral CD4 T_N cells gained Ly-6C expression when transferred into MHC class II-deficient recipients. Second, Ly-6C⁻ CD4 T_N cells expressed more CD5 and exhibited a higher degree of CD3 ζ phosphorylation than Ly-6C⁺ CD4 T_N cells. Third, Ly-6C⁻ CD4 T_N cells exhibit a higher degree of co-clustering of the CD4 co-receptor and the TCR-associated signalling molecule, ZAP-70, than their Ly-6C⁺-cell counterparts. Finally, interactions with MHC class II molecules retained

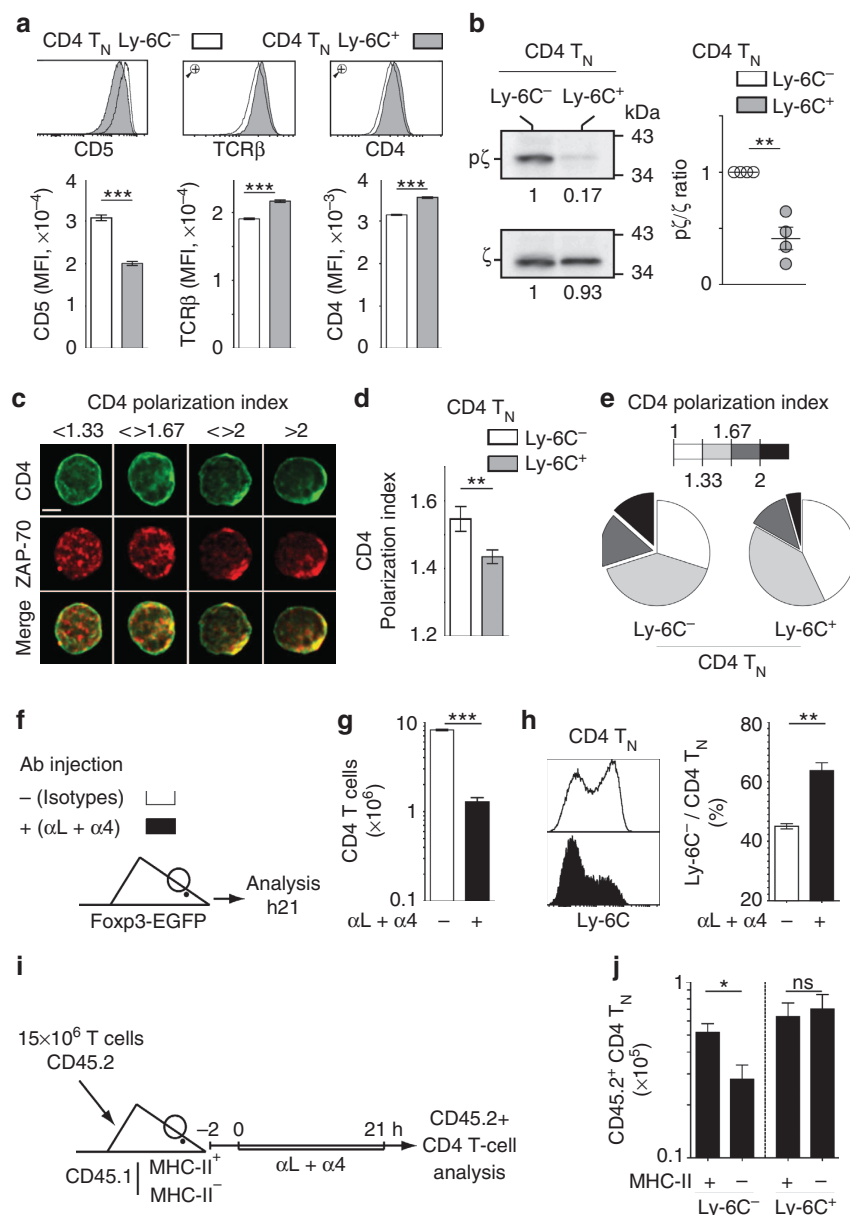


Figure 6 | Ly-6C⁻ CD4 T_N cells continuously interact with MHC class II molecules. (a) CD5, TCRβ and CD4 fluorescence histograms of gated Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from LNs of a representative C57BL/6 Foxp3-GFP mouse. Mean fluorescence intensities (MFIs) are shown as means ± s.e.m. for at least six mice from two independent experiments. (b) Flow-cytometry-sorted Ly-6C⁻ and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (3 × 10⁵ cells/condition) were lysed, and both CD3ζ protein levels (ζ) and the extent of CD3ζ chain phosphorylation (pζ) were determined by immunoblotting. The pζ/ζ ratio was then quantified. Each dot represents an individual sample. (c,d) LN cells from C57BL/6 Foxp3-GFP mice were fixed immediately in 4% paraformaldehyde after isolation. Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were then purified and stained for CD4 (green) and ZAP-70 (red) expression. (c) Representative CD4 and ZAP-70 sum-projection images are shown. Scale bar, 5 μm. (d) CD4 polarization indexes were estimated for Ly-6C⁻ (n = 212) or Ly-6C⁺ (n = 352) CD4 T_N cells by automated analyses of two independent experiments (see Methods). (e) Distribution of Ly-6C⁻ or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells as a function of their CD4 polarization index. (f-h) C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not intraperitoneally with anti-αL and anti-α4 Abs to block LN entry. Twenty-one hours later, LNs were recovered and CD4 T cells were analysed. (f) Diagram illustrating the experimental model. (g) Absolute numbers of CD4 T cells in mLN. (h) Representative Ly-6C fluorescence histograms and percentages of Ly-6C⁻ cells are shown for CD4 T_N cells recovered from mLN of treated and untreated mice. (i-j) T cells (15 × 10⁶) from CD45.2 C57BL/6 Foxp3-GFP mice were transferred into C57BL/6 CD45.1 mice lacking (MHC-II⁻) or not lacking (MHC-II⁺) MHC class II molecule expression. Two hours later, LN entry was blocked. LNs were collected 21 h after entry blockade, and CD45.2⁺ CD4 T cells were analysed. (i) Diagram illustrating the experimental model. (j) Absolute numbers of CD45.2⁺ CD4 T cells in mLN. Results are representative of at least two independent experiments. Significance of differences between two series of results was assessed using a two-tailed paired (b) or unpaired (d,g,h,j) Student's t-test. Values of P < 0.05 were considered as statistically significant (*P < 0.05; **P < 0.01; and ***P < 0.001). ns, not significant.

preferentially Ly-6C⁻ CD4 T_N cells within LNs, therefore increasing their transit time. Thus, altogether, our data indicate that Ly-6C⁻ CD4 T_N cells are more 'autoreactive' than their Ly-6C⁺-cell counterparts.

Repeated subthreshold TCR stimulations are triggered within secondary lymphoid organs where T cells interact with self-peptides while scanning the surface of dendritic cells. Stefanova *et al.*³⁸ have first shown that interruption of CD4 T_N-cell contact

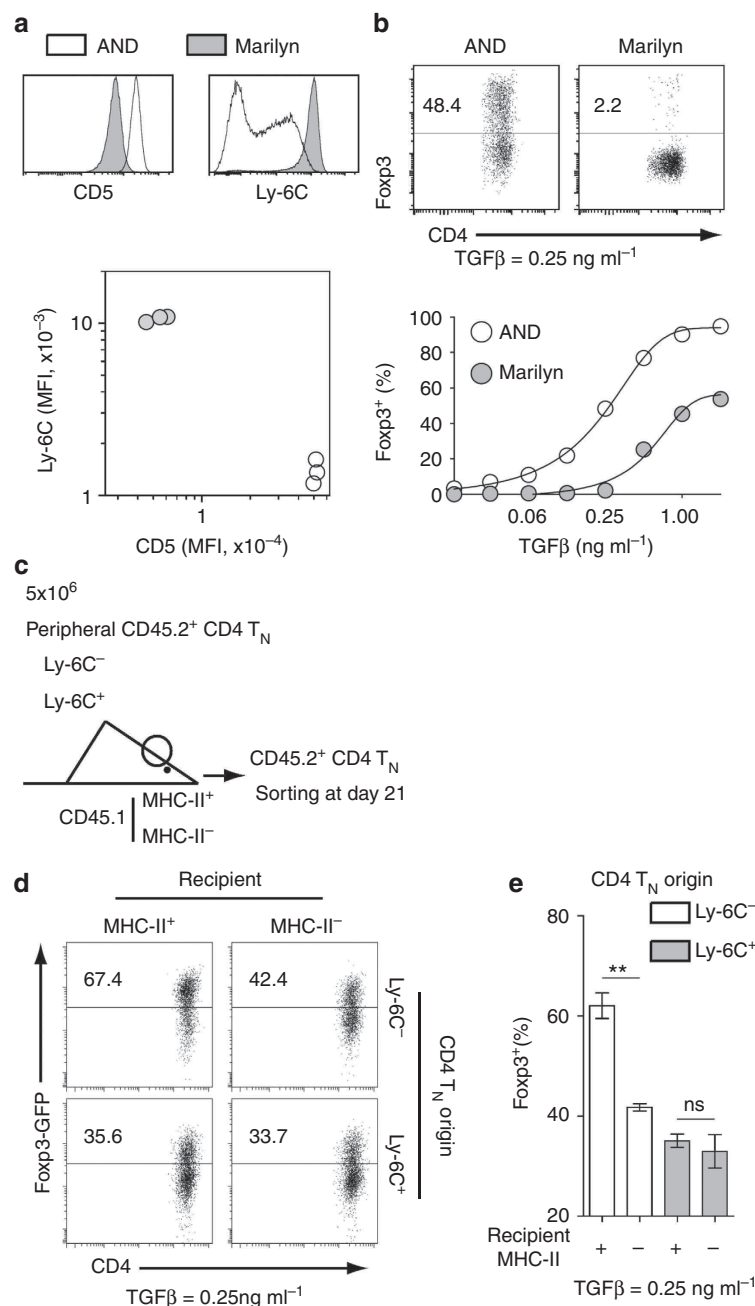


Figure 7 | Self-recognition reinforces the ability of CD4 T $_N$ cells to differentiate into iTreg cells. (a) CD5 and Ly-6C fluorescence histograms and graph representing Ly-6C MFI of gated CD4 T $_N$ cells from LNs of AND (solid line/white) and Marilyn (filled histogram/grey) TCR-transgenic mice as a function of their CD5 MFI. Each dot represents an individual mouse. **(b)** CD4 T $_N$ cells from LNs of AND and Marilyn TCR-transgenic mice were stimulated for 4 days with coated anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence of graded concentrations of TGF β 1. Representative Foxp3/CD4 dot-plots for gated CD4 T cells and the proportion of Foxp3 $^{+}$ cells among CD4 T cells are shown as a function of TGF β 1 concentration. **(c–e)** Ly-6C $^{-}$ (5×10^6) or Ly-6C $^{+}$ CD4 T $_N$ cells from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice were injected i.v. into CD45.1 C57BL/6 mice lacking or not lacking MHC class II molecule expression (MHC-II $^{-}$ and MHC-II $^{+}$, respectively). CD45.2 $^{+}$ CD4 T $_N$ cells were then FACS-sorted 21 days after transfer from the periphery of recipient mice and stimulated for 4 days with coated anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence of 0.25 ng ml $^{-1}$ of TGF β 1. **(c)** Diagram illustrating the experimental model. **(d)** Representative Foxp3-GFP/CD4 dot-plots for gated CD4 T cells are shown as a function of recipient mice and CD4 T $_N$ -cell origin. **(e)** Proportion of Foxp3 $^{+}$ cells among CD4 T cells as a function of recipient mice and CD4 T $_N$ cells origin are shown as means \pm s.e.m. for at least six mice from two independent experiments. Significance of differences between two series of results was assessed using a two-tailed unpaired Student's *t*-test. Values of $P < 0.05$ were considered as statistically significant (** $P < 0.01$). ns, not significant.

with self leads to a rapid decline on signalling and response sensitivity to foreign stimuli. These data were further confirmed by several elegant studies and shown to apply also to CD8 T $_N$ cells^{41–43}. Recently, using CD5 expression to discriminate

between T $_N$ cells interacting strongly (CD5^{hi}) or not (CD5^{lo}) with self, several groups have shown that TCR contact with self in the periphery causes CD8 T $_N$ cells to be hypersensitive to IL-2, IL-7 and IL-15 (refs 44–46). Altogether, these results strongly suggest

that self-recognition not only allows the survival of T_N cells but also increase quantitatively their responsiveness towards their cognate antigens for both CD4 and CD8 T_N cells, and towards ILs in the case of CD8 T_N cells⁴⁷. However, it has not been yet addressed whether self-recognition qualitatively affects the response of T_N cells to stimulation. Here we propose that the ability of a CD4 T_N cell to differentiate into an iTreg cell upon appropriate stimulation would be shaped by self-reactivity. In line with this assumption, Ly-6C[−] CD4 T_N cells that are likely to interact strongly with MHC class II molecule-expressing cells in LNs are the cells that differentiate more efficiently into iTreg cells both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, disruption of interactions with MHC class II molecules decreases the commitment efficacy of Ly-6C[−] CD4 T_N cells towards the iTreg-cell lineage. Indeed, the iTreg-cell polarization potential of Ly-6C[−] CD4 T_N cells parked for 3 weeks in MHC class II-deficient recipients dropped to the level observed in Ly-6C⁺ CD4 T_N cells, the potential of which is not affected by MHC deprivation. Thus, self-recognition may affect not only quantitatively but also qualitatively the response of CD4 T_N cells to their cognate antigens.

Upon activation, a CD4 T_N cell can differentiate into a great variety of effector cells including T_H1 , T_H2 , T_H17 or iTreg cells. The present paradigm assumes that the choice made by CD4 T_N cells to commit into one of these lineages would be mainly governed by extrinsic factors with an important role of the cytokines released in the environment at the time of their activation. Several data, including those presented here, extend this theory by showing that intrinsic factors also have a role in CD4 T_N -cell fate determination. Fifteen years ago, several studies have proposed that the strength of the TCR signal at the time of antigen recognition would have a role in the T_H1/T_H2 lineage choice^{48,49}. More recently, Gottschalk *et al.*⁵⁰ have shown that a low dose of a strong agonist resulted in maximal induction of iTreg cells. Thus, differentiation of CD4 T_N cells into iTreg cells upon stimulation relies not only on extrinsic factors such as the presence of TGF β in their environment but also on intrinsic factors such as the avidity of the TCR, which they express for both self and foreign ligands.

Altogether, our results strongly suggest that CD4 T_N cells with the highest avidity for self (Ly-6C[−] CD4 T_N cells) have a biased commitment towards the iTreg-cell lineage and that this intrinsic ability is linked to their enhanced pathogenicity when injected into lymphopenic mice. Indeed, colitis in mice transferred with Ly-6C[−] CD4 T_N cells is prevented if Tregs are depleted. This last result may appear paradoxical, given the vast literature showing that Tregs prevent colitis in lymphopenic mice when co-transferred together with CD4 T_N cells. The nature of Tregs by itself (natural versus induced Tregs), their number (iTregs represent from 4.7 to 11.4% of the CD4 T cells recovered from the secondary lymphoid organs of recipient mice at the end point of our experiments, whereas when co-injected at a physiological rate together with CD4 T_N cells (one Treg for eight CD4 T_N cells), they represent >25% of expanding peripheral CD4 T cells as soon as 1 week after transfer⁵¹) or the timing of the presence of Tregs in the periphery (from the beginning when co-transferred together with CD4 T_N cells versus the time required for their generation and expansion in our setting) may explain these opposite effects of Tregs in the IBD experimental model.

In other settings, in particular in lymphoreplete animals, an enhanced ability of the most autoreactive CD4 T_N cells to commit to the iTreg-cell lineage pathway might represent a previously undescribed mechanism of self-tolerance. This process would diminish the risk of the most self-reactive CD4 T cells to become deleterious effector cells through responding to bacteria, viruses or parasites. Indeed, such a mechanism would allow the organism

to augment its own protection during each infectious episode, especially by avoiding molecular mimics to induce novel, potent and self-peptide-reactive CD4 T-cell effectors when T-cell responses raised against the pathogen cross-react with self-peptides.

Methods

Mice. C57BL/6 mice (CD45.2) were obtained from Charles River Laboratories. C57BL/6 CD45.1, C57BL/6 CD3 ϵ ^{−/−}, C57BL/6 MHC-II^{ΔΔ} CD45.1 and C57BL/6 AND TCR-transgenic RAG2^{−/−} mice were maintained in our own animal facilities, under specific pathogen-free conditions. C57BL/6 Marilyn TCR-transgenic RAG2^{−/−} mice were provided by Dr Emmanuel Donnadieu, Institut Cochin, Paris, France. C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2⁵² and C57BL/6 DERE⁵³ mice were initially obtained from Dr Bernard Malissen, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, France, and Dr Tim Sparwasser, Institute of Infection Immunology, TWINCORE, Hannover, Germany, respectively. C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.2 mice were then crossed with C57BL/6 CD45.1 mice to generate C57BL/6 Foxp3-GFP CD45.1 mice. C57BL/6 RAG2p-GFP reporter mice⁵³ were provided by Dr Antonio Bandeira, Unité du Développement des Lymphocytes, Institut Pasteur, Paris, France. Four- to 12-week-old mice were used for all experiments. Donor and recipient mice were sex-matched. Experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Veterinary Department. All procedures performed were approved by the Paris-Descartes Ethical Committee for Animal Experimentation (decision CEEA34.CA.080.12).

Cell suspensions. pLNs, mLNs, spleen and thymus were homogenized and passed through a nylon cell strainer (BD Falcon) in RPMI 1640 Glutamax (Gibco) supplemented with 10% FCS (Biocrom) for adoptive transfer (LNs only), or in 5% FCS and 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) in PBS for flow cytometry.

Adoptive transfer of CD4 T_N cells. CD4 T cells were purified from LNs (pooled superficial cervical, axillary, brachial, inguinal and mLNs) or thymi of C57BL/6 Foxp3-GFP or DERE mice by incubating cell suspensions on ice for 20 min with a mixture of anti-CD8 (53-6.7), anti-CD11b (Mac-1) and anti-CD19 (1D3) Abs obtained from hybridoma supernatants, and then with magnetic beads coupled to anti-rat immunoglobulins (Dyna Beads). Purified CD4 T cells were then labelled with biotinylated anti-Ly-6C (AL-21), PE-conjugated anti-CD25 (PC61), APC-conjugated anti-CD44 (IM7), all from BD Biosciences, and Pacific Blue-conjugated streptavidin (Invitrogen). Ly-6C[−] and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were sorted as GFP[−] CD25[−] CD44^{−/lo} cells using a FACS-ARIA3 flow cytometer (BD Biosciences) and injected intravenously into sex-matched recipient mice. In the experiments depicted in Fig. 3d–f and Supplementary Fig. 7, recipient mice were injected intraperitoneally 2 consecutive days per week with 500 ng of DT (Sigma-Aldrich).

Adoptive transfer of BM cells. BM cells were incubated on ice for 20 min with anti-CD4 (GK1.5) and anti-CD8 α (53-6.7) Abs, obtained from hybridoma supernatants, and then with magnetic beads coupled to anti-rat immunoglobulin (Dyna Beads). We injected 5×10^6 T-cell-depleted BM cells intravenously into each lethally irradiated (9.5 Gy) recipient mouse.

Cell surface staining and flow cytometry. Cell suspensions were collected and dispensed into 96-well round-bottom microtiter plates (Greiner Bioscience; 6×10^6 cells per well). Surface staining was performed by incubating the cells on ice, for 15 min per step, with Abs in 5% FCS (Biocrom) and 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) PBS. Each cell-staining reaction was preceded by a 15-min incubation with a purified anti-mouse CD16/32 Ab (Fc γ RII/III block; 2.4G2) obtained from hybridoma supernatants. For determination of intracellular cytokine production, cells were stimulated with $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ phorbol myristate acetate (Sigma-Aldrich), $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ionomycin (Sigma-Aldrich) and $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Brefeldin A (Sigma-Aldrich) for 2 h at 37 °C. Cells were then stained for surface markers, fixed in 2% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.5% saponin, followed by labelling with specific cytokine Abs.

PerCP-conjugated anti-CD4 (RM4-5), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD5 (53-7.3), anti-CD25 (PC61), anti-CD45.1 (A20), anti-CD69 (H1.2F3), anti-TCR β (H57-597), anti-IL-2 (JES6-5H4), anti-IL-4 (11B11), anti-IL-10 (JES5-16E3) and anti-IL-17A (TC11-18H10), APC-conjugated anti-CD44 (IM7), anti-TCR β (H57-597), anti-IFN- γ (XMG1.2), streptavidin, fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-TNF- α (MP6-XT22), PE-Cy7-conjugated anti-Ly-6C (AL-21), streptavidin, PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD45.2 (104), APC-H7-conjugated anti-CD8 (53-6.7), Pacific Blue-conjugated anti-CD4 (RM4-5), and Alexa Fluor 700-conjugated anti-Ly-6C (AL-21), biotinylated anti-Ly-6C (AL-21), anti-CD5 (53-6.7), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104), anti-CD45RB (16A) and anti-CD62L (MEL14) were obtained from BD Biosciences. PE-conjugated anti-CD45.2 (104), PE-Cy5-conjugated anti-CD25 (PC61.5), Alexa Fluor 700-conjugated anti-CD45.2 (104), PerCP-Cy5.5-conjugated anti-TCR β (H57-597) and biotinylated anti-CD127 (A7R34) were obtained from eBioscience. Pacific Blue-conjugated streptavidin was obtained from Invitrogen.

Multi-colour immunofluorescence was analysed using a BD-LSR2 cytometer (BD Biosciences). List-mode data files were analysed using Diva software (BD Biosciences). Data acquisition and cell sorting were performed on the Cochin Immunobiology facility.

Immunoblot analysis. Ly-6C[−] and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells (3 × 10⁵ cells per condition) were flow-cytometry sorted as described above, washed in ice-cold PBS and lysed in lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8.0), 5 mM NaPiP, 1 mM, Na₃VO₄, 20 mM NaPO₄ (pH 7.6), 3 mM β-glycerophosphate, 10 mM NaF, 1% Triton X-100, complete protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche)) for 15 min on ice. Samples were centrifuged, and whole-cell lysates were collected. Unreduced proteins were separated on a 12% SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and immunoblotted first with an anti-Phosphotyrosine Ab (Clone 4G10; Millipore) and, after stripping, with an anti-CD3ζ Ab (Clone 6B10.2; Santa Cruz Biotechnology). Signals were quantified using the Image J software. The ratio p^{tyr}/ζ was estimated as previously described⁵⁴.

Immunofluorescence microscopy. Freshly isolated LN cells were first fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 5 min at 37 °C. Ly-6C[−] and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were then sorted using flow cytometry as described above and stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4 Ab. T cells were then permeabilized and incubated with an anti-ZAP-70 Ab (Transduction Laboratories) followed by anti-mouse Ab conjugated to Alexa Fluor 647 (Molecular Probes). Stained T cells were photographed on a Yokogawa spinning-disk confocal microscope with a × 100 oil immersion objective connected to a digital video camera and analysed using Image J software. Briefly, automated analysis was performed to divide each cell into quadrants and then to measure the average intensity in each quadrant. The CD4 polarization index was calculated by dividing the highest quadrant by the lowest.

Colitis scoring. For the colitis model, colons were removed and fixed in PBS containing 10% formaldehyde. Five-micrometer paraffin-embedded sections were cut and stained with haematoxylin and eosin and then blindly analysed. Each segment was given a score of 0–4: grade 0, no significant changes; grade 1, minimal scattered mucosal inflammatory cell infiltrates, with or without minimal epithelial hyperplasia; grade 2, mild scattered to diffuse inflammatory cell infiltrates, sometimes extending into the submucosa and associated with erosions, with mild to moderate epithelial hyperplasia and mild to moderate mucin depletion from goblet cells; grade 3, moderate inflammatory cell infiltrates that were sometimes transmural, with moderate to severe epithelial hyperplasia and mucin depletion; grade 4, marked inflammatory cell infiltrates that were often transmural and associated with crypt abscesses and occasional ulceration, with marked epithelial hyperplasia, mucin depletion and loss of intestinal glands.

In vitro polarization assays. Flow-cytometry sorted Ly-6C[−] and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice were stimulated for 4 days with immobilized anti-CD3 (clone 145.2C11; 4 μg ml^{−1}; obtained from hybridoma supernatants) and anti-CD28 (clone 37.51; eBioscience; 4 μg ml^{−1}) Abs, in the presence of graded concentrations of exogenous recombinant human TGFβ1 (Invitrogen) in the presence (T_H17) or absence (iTreg) of 20 ng ml^{−1} of recombinant mouse IL-6 (Invitrogen). To study the ability of CD4 T_N cells to differentiate into T_H1 effector cells, stimulation was performed in the presence of graded concentrations of recombinant mouse IL-12 (R&D).

In vitro suppression assay. Purified Ly-6C[−] or Ly-6C⁺ CD4 T_N cells were stimulated for 3 days with coated anti-CD3 and anti-CD28 Abs in the presence of 1 ng ml^{−1} of TGFβ1 and then let to rest for 3 more days in the presence of recombinant human IL-2 (13 ng ml^{−1}; R&D). GFP-expressing cells were then sorted using flow cytometry, and the suppressive capacities of these highly purified Foxp3-expressing cells were then assessed as previously described³¹. Briefly, conventional CD4 T cells (GFP[−] CD4⁺ T cells) were purified from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP mice, labelled with Cell Trace Violet (Invitrogen) and stimulated for 64 h, alone or together with Treg cells at various Treg/Tconv-cell ratios.

Suboptimal T-cell activation in vitro assay. Flow-cytometry sorted Ly-6C[−] and Ly-6C⁺ CD4 T_N cells from LNs of C57BL/6 Foxp3-GFP were stimulated for 3 days with irradiated splenocytes from C57BL/6 CD3ε^{−/−} mice in the presence of graded concentrations of soluble anti-CD3 Ab (145.2C11). These experiments were conducted in the absence of addition of exogenous cytokines.

Blocking T-cell entry into LNs. C57BL/6 Foxp3-GFP mice were injected or not intraperitoneally with 200 μg of anti-αL and anti-α4 Abs (Bio-Xcell) to block LN entry. Twenty-one hours later, LNs were collected, and CD4 T cells were analysed. In some experiments (Fig. 6i,j), 15 × 10⁶ T cells from CD45.2 C57BL/6 Foxp3-GFP mice were transferred into C57BL/6 CD45.1 mice lacking (MHC-II[−]) or not

lacking (MHC-II⁺) MHC class II molecule expression. Two hours later, LN entry was blocked as described above. LNs were collected 21 h after entry blockade, and CD45.2⁺ CD4 T cells were analysed.

References

- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348–2357 (1986).
- Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787–793 (1996).
- Ye, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXCR chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* **194**, 519–527 (2001).
- Liang, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* **203**, 2271–2279 (2006).
- Bilate, A. M. & Lafaille, J. J. Induced CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells in immune tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 733–758 (2012).
- Szabo, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655–669 (2000).
- Zheng, W. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587–596 (1997).
- Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor RORγ¹ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121–1133 (2006).
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T-cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057–1061 (2003).
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–336 (2003).
- Groux, H. *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737–742 (1997).
- Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor-β ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* **9**, 1341–1346 (2008).
- Nurieva, R. I. *et al.* Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* **29**, 138–149 (2008).
- Hsieh, C. S. *et al.* Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547–549 (1993).
- Kopf, M. *et al.* Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* **362**, 245–248 (1993).
- Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-β induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–1886 (2003).
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
- Betelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
- Corse, E., Gottschalk, R. A. & Allison, J. P. Strength of TCR-peptide/MHC interactions and in vivo T cell responses. *J. Immunol.* **186**, 5039–5045 (2011).
- Schlueter, A. J. *et al.* Distribution of Ly-6C on lymphocyte subsets: I. Influence of allotype on T lymphocyte expression. *J. Immunol.* **158**, 4211–4222 (1997).
- McHeyzer-Williams, L. J. & McHeyzer-Williams, M. G. Developmentally distinct Th cells control plasma cell production *in vivo*. *Immunity* **20**, 231–242 (2004).
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B. & Coffman, R. L. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int. Immunol.* **5**, 1461–1471 (1993).
- Martin, B. *et al.* Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells *in vivo*. *J. Immunol.* **172**, 3391–3398 (2004).
- Pandeyan, P. *et al.* CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells *in vitro* and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity* **34**, 422–434 (2011).
- Chen, Y. *et al.* Foxp3(+) regulatory T cells promote T helper 17 cell development *in vivo* through regulation of interleukin-2. *Immunity* **34**, 409–421 (2011).
- Lahl, K. *et al.* Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* **204**, 57–63 (2007).
- Gabrysova, L. *et al.* Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF-β-dependent differentiation and maintenance of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1242–1248 (2011).
- Oliveira, V. G., Caridade, M., Paiva, R. S., Demengeot, J. & Graca, L. Sub-optimal CD4+ T-cell activation triggers autonomous TGF-β-dependent conversion of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1249–1255 (2011).

29. Boursalian, T. E., Golob, J., Soper, D. M., Cooper, C. J. & Fink, P. J. Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat. Immunol.* **5**, 418–425 (2004).
30. Poitrasson-Riviere, M. *et al.* Regulatory CD4⁺ T cells are crucial for preventing CD8⁺ T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol.* **180**, 7294–7304 (2008).
31. Delpoux, A. *et al.* Foxp3-independent loss of regulatory CD4⁺ T-cell suppressive capacities induced by self-deprivation. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1237–1249 (2012).
32. Martin, B., Becourt, C., Bienvenu, B. & Lucas, B. Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4⁺ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood* **108**, 270–277 (2006).
33. Le Campion, A. *et al.* Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. *Blood* **114**, 1784–1793 (2009).
34. Azzam, H. S. *et al.* CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* **188**, 2301–2311 (1998).
35. Smith, K. *et al.* Sensory adaptation in naive peripheral CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1253–1261 (2001).
36. Mandl, J. N. *et al.* Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 18036–18041 (2012).
37. Mandl, J. N., Monteiro, J. P., Vriskoop, N. & Germain, R. N. T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity* **38**, 263–274 (2012).
38. Stefanova, I., Dorfman, J. R. & Germain, R. N. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* **420**, 429–434 (2002).
39. Grandjean, I. *et al.* Are major histocompatibility complex molecules involved in the survival of naive CD4⁺ T cells? *J. Exp. Med.* **198**, 1089–1102 (2003).
40. Kassiotis, G., Zamoyska, R. & Stockinger, B. Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J. Exp. Med.* **197**, 1007–1016 (2003).
41. Lo, W. L. *et al.* An endogenous peptide positively selects and augments the activation and survival of peripheral CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **10**, 1155–1161 (2009).
42. Ebert, P. J., Jiang, S., Xie, J., Li, Q. J. & Davis, M. M. An endogenous positively selecting peptide enhances mature T cell responses and becomes an autoantigen in the absence of microRNA miR-181a. *Nat. Immunol.* **10**, 1162–1169 (2009).
43. Hochweller, K. *et al.* Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 5931–5936 (2010).
44. Cho, J. H., Kim, H. O., Surh, C. D. & Sprent, J. T cell receptor-dependent regulation of lipid rafts controls naive CD8⁺ T cell homeostasis. *Immunity* **32**, 214–226 (2010).
45. Stoklasek, T. A., Colpitts, S. L., Smilowitz, H. M. & Lefrançois, L. MHC class I and TCR avidity control the CD8⁺ T cell response to IL-15/IL-15Rα complex. *J. Immunol.* **185**, 6857–6865 (2010).
46. Palmer, M. J., Mahajan, V. S., Chen, J., Irvine, D. J. & Lauffenburger, D. A. Signaling thresholds govern heterogeneity in IL-7-receptor-mediated responses of naive CD8⁺ T cells. *Immunol. Cell. Biol.* **89**, 581–594 (2011).
47. Garbi, N., Hammerling, G. J., Probst, H. C. & van den Broek, M. Tonic T cell signalling and T cell tolerance as opposite effects of self-recognition on dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 601–608 (2010).
48. Hosken, N. A., Shibuya, K., Heath, A. W., Murphy, K. M. & O'Garra, A. The effect of antigen dose on CD4⁺ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-αβ-transgenic model. *J. Exp. Med.* **182**, 1579–1584 (1995).
49. Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P. & Bottomly, K. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4⁺ T cell differentiation. *J. Immunol.* **159**, 5956–5963 (1997).
50. Gottschalk, R. A., Corse, E. & Allison, J. P. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 *in vivo*. *J. Exp. Med.* **207**, 1701–1711 (2010).
51. Le Campion, A. *et al.* IL-2 and IL-7 determine the homeostatic balance between the regulatory and conventional CD4⁺ T cell compartments during peripheral T cell reconstitution. *J. Immunol.* **189**, 3339–3346 (2012).
52. Wang, Y. *et al.* Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* **180**, 1565–1575 (2008).
53. Yu, W. *et al.* Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature* **400**, 682–687 (1999).
54. Dorfman, J. R., Stefanova, I., Yasutomo, K. & Germain, R. N. CD4⁺ T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling. *Nat. Immunol.* **1**, 329–335 (2000).

Acknowledgements

We greatly acknowledge K. Labroquère, L. Stouvenel and M. Andrieu from the Cochin Immunobiology facility, and B. Durel and P. Bourdoncle from the Cochin Cellular Imaging facility. We would like to thank A. Bandeira, E. Donnadiu, C. A. Dutertre and A. Henino for providing tools and advice, and T. Guilbert for his invaluable help in image analysis. This work was supported by grants from the 'Ligue contre le Cancer' and the 'Association pour la Recherche contre le Cancer'. A.P. was supported by a PhD fellowship from the 'Association pour la Recherche sur le Cancer'. A.A. was supported by a master fellowship from the 'Fondation pour la Recherche Médicale'.

Author contributions

Br.M., C.A., B.S. and B.L. designed experiments. Br.M., C.A., A.D. A.P., C.C., P.Y., H.d.B., N.B. and A.A. did the experiments. T.S. and Be.M. provided tools. Br.M., C.A. and B.L. wrote the paper.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Martin, B. *et al.* Highly self-reactive naive CD4⁺ T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nat. Commun.* **4**:2209 doi: 10.1038/ncomms3209 (2013).

Article 5 :

Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4⁺ T cells.

PNAS 2013 Aug 6;110(32):13085-90

Arnaud Pommier, Alexandra Audemard, Aurélie Durand, Renée Lengagne, Arnaud Delpoux, Bruno Martin, Laetitia Douguet, Armelle Le Campion, Masashi Kato, Marie-Françoise Avril, Cédric Auffray, Bruno Lucas, Armelle Prévost-Blondel.

Cette étude évalue l'impact des populations immunitaires sur le développement métastatique dans un modèle de mélanome spontané [souris exprimant l'oncogène RET humain sous le contrôle du promoteur de la métallothionéine (souris MT/ret)]. Dans ce modèle, les cellules cancéreuses diffusent tôt, mais restent en dormance pendant plusieurs semaines. Puis, les souris MT/ret développent des métastases cutanées et, enfin, des métastases à distance. Un total de 35% des souris MT/ret développent un vitiligo qui est une dépigmentation de la peau due à la lyse des mélanocytes normaux, associé à un retard dans la progression tumorale. Ici, nous constatons que lymphocytes T CD4⁺ régulateurs s'accumulent dans la peau, la rate, et les ganglions lymphatiques drainant la tumeur dans souris MT/ret ne développant pas de vitiligo. La déplétion des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs et la neutralisation de l'IL-10 conduit à une augmentation de l'apparition du vitiligo qui est corrélée à une diminution de l'incidence des métastases du mélanome. En revanche, les monocytes inflammatoires et cellules dendritiques inflammatoires s'accumulent dans la peau des souris MT/ret présentant un vitiligo actif. De plus, ils inhibent la prolifération des cellules tumorales *in vitro* par un mécanisme dépendant des réactifs oxygénés, et leur déplétion ainsi que la neutralisation de ces réactifs oxygénés *in vivo*, entraîne une augmentation de la dissémination tumorale. Dans l'ensemble, nos données suggèrent que les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs favorisent la progression tumorale, en partie, par l'inhibition du recrutement et/ou de la différenciation des monocytes inflammatoires dans la peau.

Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4⁺ T cells

Arnaud Pommier^{a,b,c}, Alexandra Audemard^{a,b,c}, Aurélie Durand^{a,b,c}, Renée Lengagne^{a,b,c}, Arnaud Delpoux^{a,b,c}, Bruno Martin^{a,b,c}, Laetitia Douguet^{a,b,c}, Armelle Le Campion^{a,b,c}, Masashi Kato^d, Marie-Françoise Avril^{a,b,c}, Cédric Auffray^{a,b,c}, Bruno Lucas^{a,b,c,1,2}, and Armelle Prévost-Blondel^{a,b,c,1,2}

^aCentre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8104, ^bInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1016, and ^cParis Descartes University, Cochin Hospital, 75014 Paris, France; and ^dDepartment of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine, Aichi 466-8550, Japan

Edited* by Douglas T. Fearon, University of Cambridge School of Clinical Medicine, Cambridge, United Kingdom, and approved June 25, 2013 (received for review January 7, 2013)

The present study evaluates the impact of immune cell populations on metastatic development in a model of spontaneous melanoma [mice expressing the human RET oncogene under the control of the metallothionein promoter (MT/ret mice)]. In this model, cancer cells disseminate early but remain dormant for several weeks. Then, MT/ret mice develop cutaneous metastases and, finally, distant metastases. A total of 35% of MT/ret mice develop a vitiligo, a skin depigmentation attributable to the lysis of normal melanocytes, associated with a delay in tumor progression. Here, we find that regulatory CD4⁺ T cells accumulate in the skin, the spleen, and tumor-draining lymph nodes of MT/ret mice not developing vitiligo. Regulatory T-cell depletion and IL-10 neutralization led to increased occurrence of vitiligo that correlated with a decreased incidence of melanoma metastases. In contrast, inflammatory monocytes/dendritic cells accumulate in the skin of MT/ret mice with active vitiligo. Moreover, they inhibit tumor cell proliferation in vitro through a reactive oxygen species-dependent mechanism, and both their depletion and reactive oxygen species neutralization in vivo increased tumor cell dissemination. Altogether, our data suggest that regulatory CD4⁺ T cells favor tumor progression, in part, by inhibiting recruitment and/or differentiation of inflammatory monocytes in the skin.

The concept of suppressive T cells, which was first described in the early 1970s, remained poorly investigated until Sakaguchi et al. demonstrated the suppressive functions of a subset of CD4⁺ T cells now called regulatory T cells (Tregs) (1). Tregs express Foxp3 (2) and high surface levels of the α -chain of the IL-2 receptor (CD25) and are the main mediators of peripheral tolerance under physiological settings (1). Their role in the suppression of antitumor immunity was originally described in the 1980s (3) but remained, at first, largely underestimated. The demonstration that systemic depletion of Tregs favors tumor rejection in mouse models highlighted their contribution in tumor progression (4). Whereas it is established that Tregs potently interfere with tumor-specific T cells (5–8), their impact on innate immune cells, in particular, on myeloid cells, has been clearly less investigated in the context of tumor development (9, 10).

To decipher the role of Tregs in the relationship between cancer immunity and autoimmunity, we used mice expressing the human RET oncogene under the control of the metallothionein promoter (MT/ret mice) (11). In this model, the primary uveal tumor disseminates early but remains dormant for several weeks (12, 13). MT/ret mice then develop cutaneous metastases and finally distant (i.e., pulmonary, visceral, and mediastinal adenopathy) metastases (14). A significant proportion of MT/ret mice spontaneously develops vitiligo-like depigmentations. The tumor progression is significantly delayed in mice harboring vitiligo compared with mice without depigmented skin (14). The development of vitiligo in melanoma patients has also been associated with a better prognosis (15–18). It occurs most often in immunotherapeutic trials, although vitiligo may also develop in patients treated with surgery, radiotherapy, or chemotherapy.

Consistent with previous data obtained in melanoma patients (19, 20), we found that Tregs accumulated in tumor-draining

lymph nodes (TdLNs) of MT/ret mice. Treg depletion led to a decreased occurrence of cutaneous metastases and an increased percentage of mice developing vitiligo. Interestingly, inflammatory (Ly-6C^{high}) monocytes and dendritic cells (DCs), initially described as important cells during inflammatory and infectious processes, appeared to be critical effectors during the early phase of the antitumor response, in particular by killing disseminated malignant melanocytes. Altogether, our results suggest that Tregs prevent the recruitment and/or differentiation of Ly-6C^{high} monocytes in the skin, subsequently favoring tumor progression.

Results

Decreased Incidence of Cutaneous Metastases in MT/ret Mice Developing Vitiligo. MT/ret mice were monitored for the occurrence of primary uveal melanoma, cutaneous metastases, and vitiligo (*SI Appendix, Fig. S1*). Most of MT/ret mice display a primary tumor at 3 mo of age (*SI Appendix, Table S1* and ref. 12). Cutaneous metastases develop in nearly two-thirds of 6-mo-old mice and vitiligo in one-third (Fig. 1A). As described previously (14), mice with vitiligo displayed less cutaneous metastases than mice without vitiligo. Next, we compared, by flow cytometry (*SI Appendix, Figs. S2 and S3*), the proportions of the various myeloid and lymphoid subsets recovered from the spleen and cervical lymph nodes (LNs) (LNs that drained the primary tumor and facial cutaneous metastases) of 6-mo-old MT/ret mice with or without vitiligo (Fig. 1B). We did not detect any significant difference. Moreover, the proportions of these subpopulations were similar to those of age-matched control mice. Of note, melanoma cells were undetectable by flow cytometry within the secondary lymphoid organs of 6-mo-old mice (*SI Appendix, Fig. S4*).

Hematopoietic cells infiltrating cutaneous metastases were not different both quantitatively (CD45⁺ cells represented 3.9% \pm 0.5 and 5.0% \pm 0.5 of the cells recovered from metastases of mice with or without vitiligo respectively; *SI Appendix, Fig. S4*) and qualitatively (Fig. 1B) whether or not the mice displayed vitiligo. These results suggest that the protection against metastatic spreading in mice harboring vitiligo would not rely on the quantity and nature of immune cells infiltrating established tumors.

Tregs Accumulate in the Spleen and TdLNs of Nonvitiligo MT/ret Mice. Tregs (Foxp3⁺) were not more frequent within cutaneous metastases whether or not MT/ret mice displayed vitiligo (Fig. 2A

Author contributions: A.P., M.-F.A., C.A., B.L., and A.P.-B. designed research; A.P., A.A., A. Durand, R.L., A. Delpoux, B.M., L.D., A.L.C., C.A., and A.P.-B. performed research; M.K. contributed new reagents/analytic tools; A.P., A.A., A. Durand, B.L., and A.P.-B. analyzed data; and A.P., B.L., and A.P.-B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

¹B.L. and A.P.-B. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. E-mail: bruno.lucas@inserm.fr or armelle.blondel@inserm.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1300314110/-DCSupplemental.

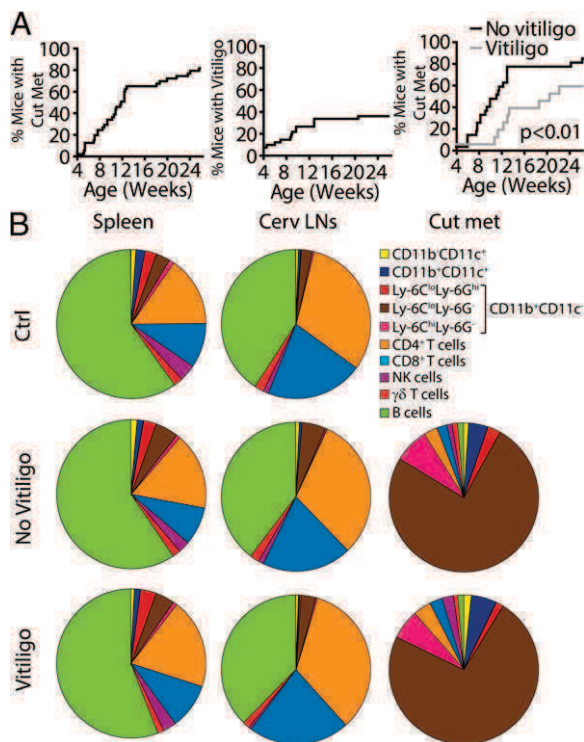


Fig. 1. Characterization of the MT/ret mouse model. Diagnosis was performed over a 6-mo period. (A, Left) Incidence of cutaneous metastases (Cut Met) in MT/ret mice ($n = 42$). (A, Center) Vitiligo occurrence in MT/ret mice. (A, Right) Cut Met incidence in MT/ret mice with ($n = 16$) or without vitiligo ($n = 26$). (B) Immune composition of tissues from 6-mo-old Ctrl or MT/ret mice with or without vitiligo. The different immune populations were defined as shown in *SI Appendix*, Figs. S2 and S3. Proportions are shown within $CD45^+$ cells for Cut Met.

and B). In contrast, Tregs accumulated both in proportion and absolute number (Fig. 2A and B and *SI Appendix*, Fig. S5) in the spleen and cervical LNs of MT/ret mice without vitiligo compared with either MT/ret mice developing vitiligo or control mice. More precisely, Tregs were more frequent in the spleen and cervical LNs whether or not they have developed cutaneous or distant metastases (*SI Appendix*, Fig. S6). By contrast, the proportion of Tregs was increased in axillary LNs only in mice developing dorsal or distant metastases and in mesenteric LNs only in mice developing distant metastases. The increase in the proportion of Tregs observed in nonvitiligo MT/ret mice was, thus, restricted to TdLNs and the spleen.

Tregs Inhibit the Onset of Vitiligo and Favor Tumor Spread. We then investigated the role of Tregs in tumor spread and the occurrence of vitiligo. MT/ret mice were injected twice a week with the anti-CD25 depleting Ab, beginning 2 d after birth and monitored from weaning up to 6 mo of age. Anti-CD25 treatment did not affect the occurrence of primary tumors (*SI Appendix*, Table S1) but significantly delayed the development of cutaneous metastases (Fig. 2C). This reduced tumor spread correlated with a significant increase in the incidence of vitiligo.

We have recently shown that T cell-deficient MT/ret mice ($RetCD3\epsilon^{KO}$ mice) developed cutaneous metastases smaller than those from T cell-competent mice (21). Here, we further observed that T-cell deficiency correlated with a significant increase in the occurrence of vitiligo (Fig. 3A). Interestingly, $RetCD3\epsilon^{KO}$ mice with vitiligo developed less cutaneous metastases than nonvitiligo $RetCD3\epsilon^{KO}$ mice. Thus, similar to MT/ret mice, vitiligo in $RetCD3\epsilon^{KO}$ mice is associated with a more efficient tumor control. To confirm that Tregs were acting on tumor cell dissemination, we reconstituted $RetCD3\epsilon^{KO}$ mice, 5 d after birth,

with $CD4^+$ T cells recovered from the spleen and cervical LNs of either C57BL/6 control mice or nonvitiligo tumor-bearing MT/ret mice. Reconstituted $RetCD3\epsilon^{KO}$ mice displayed an increased occurrence of cutaneous metastases correlated with a decrease in the incidence of vitiligo (Fig. 3B and *SI Appendix*, Table S2). Altogether, our results suggest that Tregs both inhibit vitiligo development and promote metastasis.

An Innate Immune Population Controls the Development of Cutaneous Metastases and Vitiligo. To determine which cells controlled tumor spread, we used a depleting Ab strategy. $CD8^+$ T-cell depletion had no effect on the incidence of cutaneous tumors or vitiligo (*SI Appendix*, Fig. S7A). In line with our previous data (22), the proportion of mice developing distant metastases increased after anti- $CD8$ treatment (*SI Appendix*, Table S2), indicating that $CD8^+$ T cells were not responsible for the control of cutaneous metastases but were crucial for controlling visceral dissemination.

The development of vitiligo has been associated with a production of Abs directed against melanocyte antigens (23). We surmised that $CD3\epsilon^{KO}$ mice are inefficient in producing antibodies because of the absence of $CD4$ T-cell help. To test this hypothesis, sera from T cell-deficient or -competent MT/ret mice were incubated with Melan-ret cells, a cell line derived from a cutaneous metastasis of a MT/ret mouse (14) or with Lewis lung carcinoma cells (LLCs). Significant staining (MFI ratio, >2) revealed the presence of autoantibodies in sera derived from MT/ret mice only with Melan-ret cells, but even in this case, only 9 out of 54 animals were seropositive (Fig. 3C). Thus, B lymphocytes do not seem to be required for the development of vitiligo in $RetCD3\epsilon^{KO}$ mice. Altogether, our data suggest that a cell population belonging to the innate immunity plays an important role in vitiligo development and in controlling tumor cell dissemination at the skin site.

Inflammatory Monocytes/DCs Play a Key Role in Controlling Tumor Dissemination. The occurrence of tumors and vitiligo was similar in MT/ret mice untreated or treated with an anti-NK1.1 Ab (*SI Appendix*, Table S2 and Fig. S7B), suggesting no crucial role of

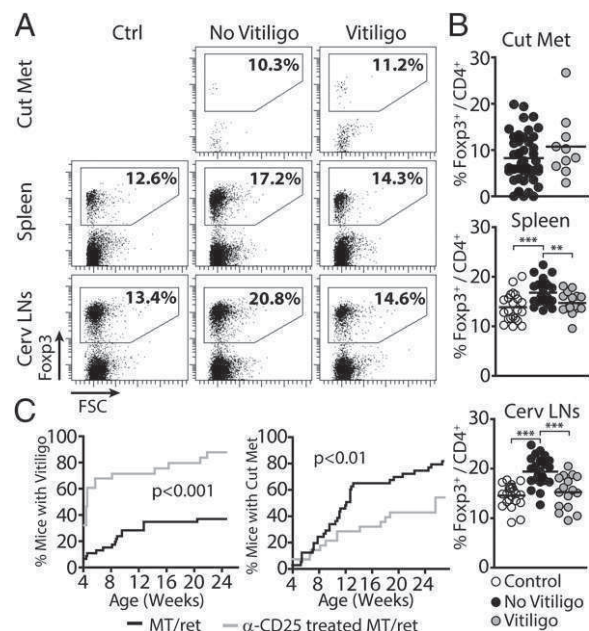


Fig. 2. Tregs accumulate in the spleen and TdLNs of MT/ret mice not developing vitiligo. (A) FSC/Foxp3 dot plots are shown for $CD45^+ CD4^+ CD8^- Tcr\beta^+$ cells from the tissues of 6-mo-old Ctrl mice and MT/ret mice with or without vitiligo. (B) Percentage of Tregs in Cut Met, spleen, and cervical lymph nodes (Cerv LNs) of the indicated mice. (C) Incidence of Cut Met and vitiligo in MT/ret mice treated ($n = 28$) or not ($n = 42$) with anti-CD25 Ab.

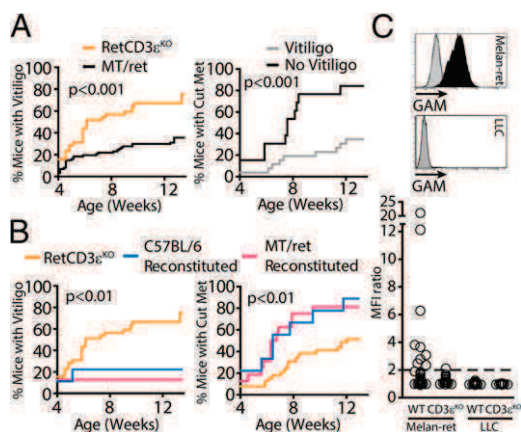


Fig. 3. Increased incidence of vitiligo in RetCD3 ϵ ^{KO} mice. (A) Vitiligo occurrence in MT/ret ($n = 87$) and RetCD3 ϵ ^{KO} ($n = 39$) mice (Left) and incidence of Cut Met in RetCD3 ϵ ^{KO} mice with or without vitiligo (Right). (B) Incidence of vitiligo and Cut Met in RetCD3 ϵ ^{KO} mice or RetCD3 ϵ ^{KO} mice reconstituted with CD4⁺ T cells from either C57BL/6 Ctrl mice ($n = 9$) or 3-mo-old MT/ret mice without vitiligo ($n = 16$). Differences were significant between untreated RetCD3 ϵ ^{KO} mice and RetCD3 ϵ ^{KO} mice reconstituted with CD4⁺ T cells from both Ctrl or MT/ret mice. (C) Flow-cytometric analysis of the presence of antitumor Abs in the sera of 3-mo-old MT/ret and RetCD3 ϵ ^{KO} mice. (C, Upper) Representative histograms (empty, staining with the secondary Ab only; gray, negative serum; black, positive serum). (C, Lower) MFI ratios were calculated by dividing the MFI obtained with a given serum by the MFI obtained with the secondary Ab.

natural killer (NK) cells in controlling tumor spread. Then, we assessed the role of cells from the myeloid lineage using the anti-Gr1 Ab. Gr1, a common epitope to Ly-6C and Ly-6G molecules, is expressed by granulocytes (Ly-6C^{low}, Ly-6G⁺), inflammatory monocytes/DCs (Ly-6C^{high}, Ly-6G⁺), and a fraction of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. In both MT/ret and RetCD3 ϵ ^{KO} mice, the treatment rapidly led to the death of a major proportion of our cohorts (Fig. 4A). Only 34.6% (9/26) of RetCD3 ϵ ^{KO} mice and 26.1% (6/23) of MT/ret mice were still alive after 3 mo of treatment. The remaining mice displayed an increased occurrence of cutaneous metastases and a decrease in vitiligo incidence (SI Appendix, Table S2). Mice displaying signs of poor health before 4 wk of age were killed. Interestingly, 56.5% of them had cutaneous metastases and nearly all of them already displayed pulmonary, visceral metastases, and/or mediastinal adenopathy (Fig. 4B). Thus, anti-Gr1 depletion acts on tumor spread at both cutaneous and distant sites. Because data were

similar in both T cell-competent and -deficient mice, it seemed likely that granulocytes or/and inflammatory monocytes/DCs, rather than T cells, were involved in this process.

Next, we treated MT/ret mice with an anti-Ly-6G Ab. Granulocyte-depleted mice displayed a higher incidence of vitiligo and less cutaneous metastases than untreated mice (Fig. 4C). Interestingly, granulocyte depletion led to a rise in Ly-6C^{high} monocytes and DCs in blood and spleen (Fig. 4D). Thus, depletion of granulocytes may act either directly through the depletion of a key protumor effector and/or indirectly by increasing Ly-6C^{high} monocyte egress from the bone marrow. Inflammatory monocytes exit the bone marrow in response to CCL2 (24). Interestingly, a single injection of CCL2 led to transient increased proportions of both granulocytes and inflammatory monocytes in the blood (SI Appendix, Fig. S8). Granulocyte depletion may, thus, increase the level of serum CCL2 and, accordingly, favor the accumulation of circulating monocytes that would mediate vitiligo and promote tumor protection. In line with this assumption, CCL2-treated MT/ret mice displayed a higher incidence of vitiligo and a more efficient tumor control than untreated mice (Fig. 4E). Altogether, our results strongly suggest that inflammatory monocytes/DCs play a key role in controlling tumor cell dissemination.

To further understand the impact of myeloid cells on tumor development, the proliferation of a melanoma cell line (Melan-ret) was dynamically monitored in vitro. When it reached exponential growth phase, Ly-6C^{high} monocytes/DCs or Ly-6G⁺ granulocytes were added (SI Appendix, Fig. S9). Ly-6G⁺ granulocytes had only a marginal effect. Conversely, Ly-6C^{high} monocytes/DCs significantly decreased the tumor cell-proliferation index, and the percentage of inhibition of tumor cell proliferation was still significant at an effector to target ratio of 2/1 (SI Appendix, Fig. S9A–C). Interestingly, *N*-acetyl cysteine (NAC), a strong inhibitor of reactive oxygen species (ROS) activity, reduced the impact of Ly-6C^{high} monocytes on tumor cell proliferation more significantly than a neutralizing anti-TNF- α Ab (SI Appendix, Fig. S9D). Consistently, the addition of NAC in drinking water from birth resulted in a decreased survival rate of treated MT/ret mice (SI Appendix, Table S2). Moreover, mice surviving until 3 mo of age displayed an increased occurrence of metastases correlated with a decreased incidence of vitiligo. Altogether, our results suggest that Ly-6C^{high} monocytes/DCs exhibit strong antitumor properties, in part through a ROS-dependent mechanism.

Inflammatory Monocytes/DCs Accumulate in the Skin of MT/ret Mice with Active Vitiligo. To identify the immune cells involved in the process of depigmentation in the MT/ret model, we studied the nature of hematopoietic cells infiltrating the skin of mice with or without vitiligo. Only inflammatory DCs were significantly more frequent in vitiginous skin of 6-wk-old MT/ret mice (SI Appendix,

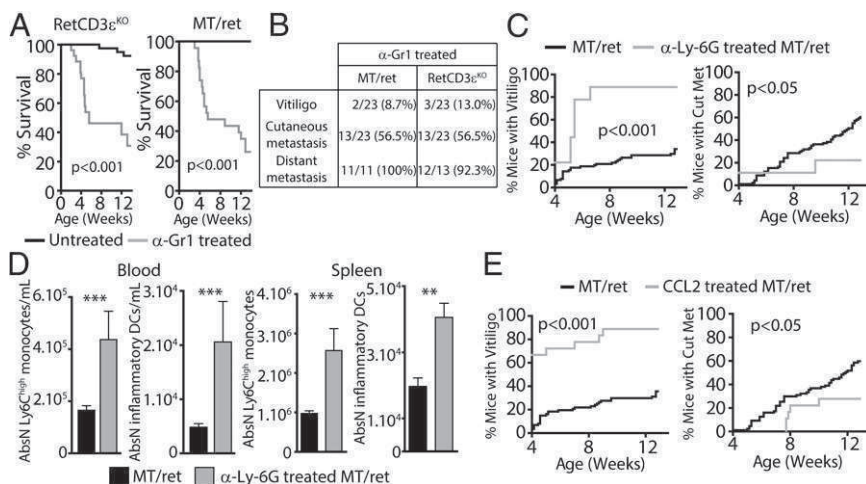


Fig. 4. Ly-6C-expressing innate immune cells are involved in vitiligo development and control of tumor spread. (A) Survival curves of RetCD3 ϵ ^{KO} ($n = 26$) and MT/ret ($n = 23$) mice treated or not with anti-Gr1 Ab. (B) Prevalence of vitiligo and cutaneous and distant metastases in 4-wk-old anti-Gr1-treated RetCD3 ϵ ^{KO} and MT/ret mice. Results are expressed as the number of mice with the indicated symptoms over the total number of analyzed mice. Numbers in brackets represent the proportion of analyzed mice with the indicated symptoms. (C) Incidence of vitiligo and Cut Met in MT/ret mice treated ($n = 9$) or not ($n = 87$) with anti-Ly-6G Ab. (D) Absolute numbers of Ly-6C^{high} monocytes and inflammatory DCs in the blood and spleen of 3-wk-old anti-Ly-6G-treated MT/ret mice compared with untreated ones. (E) Incidence of vitiligo and Cut Met in MT/ret mice treated ($n = 18$) or not ($n = 87$) with CCL2.

Fig S10). We hypothesized that actors mediating vitiligo may not remain in the skin once it has been purged of dormant malignant melanocytes. Thus, we studied the skin of 3-wk-old mice with or without active ongoing vitiligo and found that the proportions of both inflammatory monocytes and DCs were significantly higher in vitiginous skin (Fig. 5A–C). Together with the results obtained by selectively depleting populations of hematopoietic cells (*SI Appendix*, Table S2), these data strongly suggest that inflammatory monocytes/DCs are the main actors of vitiligo.

Interestingly, an increased proportion of Tregs can be detected in the skin of MT/ret mice not developing vitiligo compared with control mice or to MT/ret mice with ongoing vitiligo (Fig. 5D). Moreover, the percentages of inflammatory monocytes and DCs among skin-derived cells inversely correlate with the proportion of Tregs (Fig. 5E). This result strongly suggests that Tregs favor tumor spread by inhibiting the recruitment and/or the differentiation of inflammatory monocytes in the skin and subsequent killing of dormant malignant melanocytes.

IL-10 Inhibits the Recruitment/Differentiation of Inflammatory Monocytes/DCs in the Skin. Because skin-derived Tregs are very good IL-10 producers compared with Tregs from secondary lymphoid organs (*SI Appendix*, Fig. S11), we next investigated the impact of IL-10 on antitumor responses. The development of cutaneous metastases was significantly delayed in mice treated with an anti-IL-10 receptor (IL-10R) Ab, and this was correlated with a large increase in the occurrence of vitiligo (Fig. 6A). These curves were similar to those obtained after anti-CD25 treatment (Fig. 2D). Of note, an important proportion of Tregs in the spleen and TdLNs of MT/ret mice can be observed after IL-10 neutralization even when MT/ret mice display a vitiligo (Fig. 6B). Thus, although IL-10 neutralization does not inhibit the accumulation of Tregs in the spleen and TdLNs, it seems to counteract their protumor action.

Far more inflammatory DCs infiltrated the skin of 2- and 3-wk-old MT/ret mice treated with anti-IL-10R Ab compared with untreated animals (Fig. 6C). The proportion of Ly-6C^{high} monocytes was also increased 2 wk after birth but went back to baseline levels in 3-wk-old mice. Altogether, our data suggest that IL-10 suppress antitumor effectors of the innate immunity. The fact that similar

results were obtained by neutralizing IL-10 or depleting Tregs (Fig. 6C) suggests that IL-10 might be derived from Tregs.

Discussion

Tregs are overrepresented in the peripheral blood of patients with metastatic melanoma compared with healthy donors and are enriched in the primary tumor, TdLNs, and metastatic lesions (20). In the aggressive melanoma developed in mice on conditional deletion of the INK4A/ARF tumor suppressor genes with concomitant expression of H-RasG12V, Tregs significantly accumulate in TdLNs and tumors (25). In MT/ret mice, we found that Treg infiltration remained marginal in cutaneous metastases. Tregs may, thus, not be the main suppressor cells at the tumor site, whereas other suppressive cells may hamper antitumor immunity locally in our model. In line with such an assumption, we have recently shown that type 2 macrophages infiltrate massively the most aggressive metastases (21), which is consistent with observations in human melanoma biopsies (26–28). In contrast, the proportion of Tregs among CD4⁺ T cells was increased in the spleen and TdLNs of MT/ret mice without vitiligo, in agreement with the accumulation of Tregs observed in TdLNs few days after tumor cell implantation in several transplanted tumor models (7).

Immunosuppression mediated by Tregs is a dominant mechanism of tumor evasion. In many mouse models, CD25⁺ T-cell ablation before tumor transplantation enhances immunity, tumor clearance, and survival of recipient mice (29). In MT/ret mice, Treg depletion was associated with a significant decrease in the incidence of cutaneous metastasis. Our results contrast with those reported by Umansky and coworkers showing that anti-CD25 Ab treatment did not delay melanoma development in MT/ret mice (30). Failure of the treatment in their study may be attributable to the late-depletion strategy. Indeed, they depleted Tregs in adult MT/ret mice, whereas we treated them from day 2 after birth. Thus, in the MT/ret mouse model, Tregs may have a crucial role at early stages of spontaneous tumor development. Treg depletion from birth also induced a marked increase in the proportion of MT/ret mice developing vitiligo. In line with this result, Treg frequency is decreased and/or their suppressive capacities impaired in vitiginous or perilesional skin in humans (31–33).

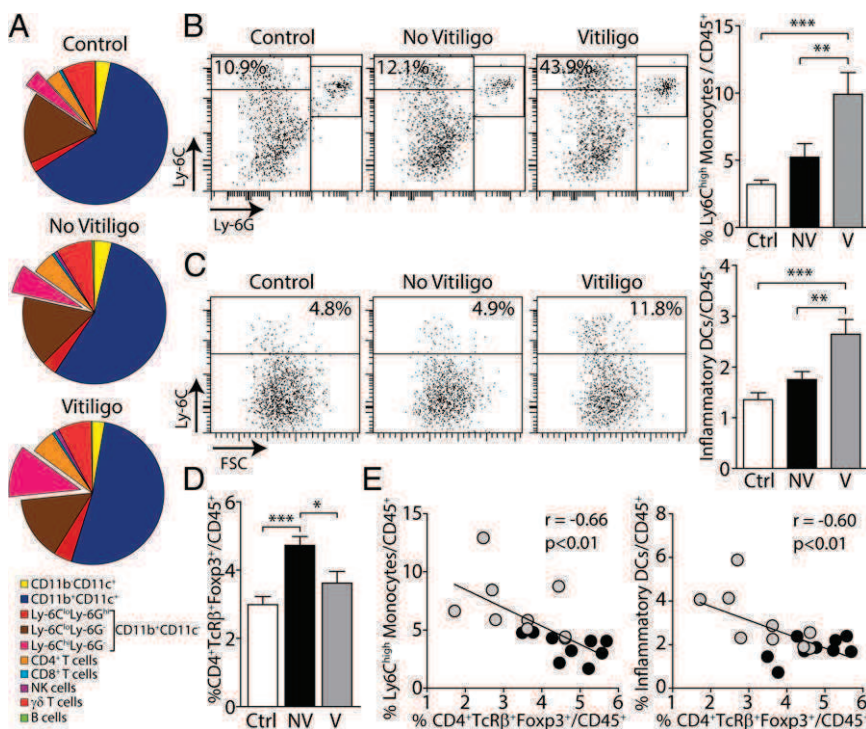


Fig. 5. Inflammatory monocytes and DCs accumulate in the skin of MT/ret mice with active vitiligo. (A) Characterization of immune cells infiltrating the skin of 3-wk-old Ctrl or MT/ret mice. Proportions are shown within CD45⁺ cells. (B) Representative Ly-6G/Ly-6C dot plots are shown for CD45⁺ cells (Left). The proportion of Ly-6C^{high} monocytes (CD11b⁺ CD11c⁺ NK1.1⁺ Ly-6G⁺ Ly-6C^{high} cells) within CD45⁺ cells was plotted (Right). (C) Representative FSC/Ly-6C dot plots are shown for CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ cells (Left). The proportion of inflammatory DCs (CD11b⁺ CD11c⁺ Ly-6C^{high} cells) within CD45⁺ cells was plotted (Right). (D) Quantification of the Treg infiltrate within CD45⁺ cells in the skin of indicated mice. (E) Correlation between the infiltration of Tregs and those of Ly-6C^{high} monocytes (Left) or inflammatory DCs (Right) in the skin of 3-wk-old MT/ret mice with (V) (gray) or without vitiligo (NV) (black).

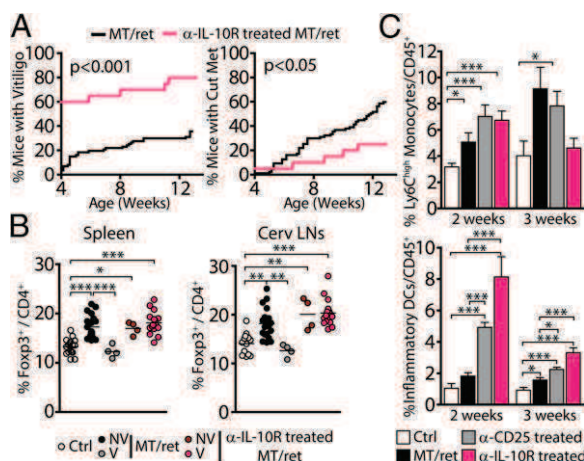


Fig. 6. Effect of IL-10R neutralization. (A) Incidence of Cut Met and vitiligo in 3-mo-old MT/ret mice treated ($n = 20$) or not ($n = 87$) with anti-IL-10R Ab. (B) Percentage of Tregs in the spleen and Cerv LNs of 3-mo-old Ctrl and MT/ret mice and anti-IL-10R-treated MT/ret mice. NV, no vitiligo; V, vitiligo. (C) The proportions of skin Ly-6C^{high} monocytes and inflammatory DCs are shown for 2- and 3-wk-old Ctrl or MT/ret mice. Proportions are shown within CD45⁺ cells.

We have shown previously that strong melanoma-specific CD8⁺ T-cell responses were detected in the secondary lymphoid organs of MT/ret mice with melanoma-associated vitiligo and that mice developing vitiligo were fully protected toward a challenge with syngeneic melanoma cells by a CD8⁺ T cell-dependent mechanism (14). Moreover, CD8⁺ T cells specific for melanocyte-differentiation antigens have been often detected in patients with vitiligo or melanoma-associated vitiligo (34, 35). Here, we found that CD8⁺ T-cell depletion from birth had no impact on the onset of vitiligo, as well as on the incidence of cutaneous metastases. A lack of implication of CD8⁺ T cells in the etiology of vitiligo and in controlling metastatic spread at the skin level fits with the results obtained in RetCD3 ϵ ^{KO} mice. Indeed, T cell-deficient MT/ret mice did not develop more aggressive cutaneous metastases than their T cell-competent littermates and yet developed a vitiligo. In MT/ret mice, increased T-cell reactivity against melanoma antigens would, thus, be a consequence of vitiligo rather than its cause. In line with this explanation, Byrne et al. have established that melanocyte destruction is crucial for inducing lasting melanoma-specific CD8⁺ T cell-mediated responses, thus illustrating that immune-mediated destruction of normal tissues can perpetuate adaptive immune responses to cancer (36).

Our study provides unexpected insights into the mechanisms involved in the control of metastatic spread. Whereas CD8⁺ T cell- or NK cell-depleted MT/ret mice survived over the 3-mo period of diagnosis, the majority of MT/ret mice treated with the anti-Gr1 Ab rapidly died. Treatment with the anti-Ly-6G Ab or the chemokine CCL2, both resulting in a rise in circulating inflammatory monocyte and DC levels, are consistent with a key role for these innate immune cells in controlling tumor progression. Inflammatory Ly-6C^{high} monocytes are selectively recruited to inflamed tissues and lymph nodes in vivo and produce high levels of TNF- α during infection or tissue damage (37). A number of studies strongly support the conclusion that at least a proportion of TNF- α -producing inflammatory DCs are the progeny of inflammatory monocytes (38). In the MT/ret model, we assume that the dissemination of tumor cells favors the recruitment within the skin of inflammatory monocyte/DCs that subsequently may lyse transformed, as well as normal, melanocytes by a bystander effect. Distinct mechanisms of monocyte-mediated tumoricidal activity have been highlighted using melanoma cell lines as target cells, related either on a direct recognition and cytotoxicity or on antibody-mediated lysis (39–41). Here, we found that inflammatory monocytes/DCs slowed down the in vitro growth of melanoma cells through their production of ROS, with

TNF- α being apparently less important in this process. Moreover, ROS neutralization in vivo led to increased tumor cell dissemination. Altogether, our results suggest that inflammatory monocytes/DCs exert their antitumor properties, at least in part, via a ROS-dependent mechanism.

Inflammatory monocytes and DCs accumulate in the skin of MT/ret mice with active vitiligo. Interestingly, the inverse correlation between the proportion of Tregs and the proportion of Ly-6C^{high} monocytes and DCs among skin-derived cells suggests that Tregs interfere with their antitumor properties. Rubtsov et al. have found that Treg-derived IL-10 reduces inflammation at environmental interfaces such as the skin, the gut, and the lung (42). Furthermore, IL-10 affects inflammatory monocyte recruitment and subsequent differentiation into inflammatory DCs in the liver during *Trypanosoma* infection (43). Here, we found that an anti-IL-10R Ab delayed the development of cutaneous metastases and increased the occurrence of vitiligo. Moreover, both anti-CD25 and anti-IL-10R Ab treatments led to an increase of inflammatory monocytes and DCs in the skin of 2-wk-old MT/ret mice. Thus, Treg-derived IL-10 might inhibit, in our model, monocyte recruitment and/or differentiation in the skin. Of course, IL-10 produced by other cell types than Tregs might be implicated in the control of antitumor responses. Further investigations using conditional IL-10 knockout mice would be necessary to specifically test this hypothesis. Moreover, we do not exclude that other suppressive mechanisms could account for the control of antitumor responses by Tregs.

Our study sheds lights on the actors involved in tumor control. In MT/ret mice, tumor cell dissemination occurs early because dormant cells can be detected in 2- to 3-wk-old mice (12). Disseminated cells may promote the trafficking of Ly-6C^{high} monocytes to the skin and the activation and differentiation of Ly-6C^{high} monocytes into inflammatory DCs, leading to the lysis of tumor cells and to the bystander destruction of normal melanocytes, thereby causing depigmentation. Until now, monocytic cells have been somehow considered as protumoral cells that facilitate metastatic spread by promoting tumor cell dissemination and dampening antitumor responses (44–46). Our results rather support that inflammatory monocytes are the most efficient effectors in controlling disseminated tumor cells. Thus, depending on the tumor stage (primary tumors, disseminated tumor cells, or established metastases), immune cells may display different properties, either pro- versus antitumoral, highlighting the importance of studying the antitumor response in the course of spontaneous tumor development.

Materials and Methods

Mice. MT/ret^{+/+} transgenic mice (designated as MT/ret mice) expressed heterozygously the human RET oncogene. They were used at different time points in the course of malignancy, and age-matched nontransgenic MT/ret^{−/−} littermates (designated as Ctrl mice) were used as control mice. MT/ret mice were crossed with C57BL/6 CD3 ϵ ^{KO} mice to obtain RetCD3 ϵ ^{KO}. Mice were killed at the indicated times or when considered moribund (prostrated, bristly, skinny). All these mice were maintained in our specific pathogen free animal facility. All experiments were approved by the Paris-Descartes Ethical Committee for Animal Experimentation (decision CEEA34.BLAB.001.12).

Antibody and Chemokine Treatments. Purified anti-CD25 (PC61), anti-Ly-6G (1A8), and anti-CD8 (53.6.7) Abs were obtained from BioXCell. Purified anti-Gr1 (RB6-8C5) and anti-NK1.1 (PK136) Abs were purified from hybridoma supernatants using a G protein-coupled Sephadex bead column. Mice were injected intraperitoneally twice a week with either 200 μ g of Abs or 400 μ g of CCL2 (PeproTech). NAC was obtained from Sigma-Aldrich. Mice received 1 mg/mL NAC in drinking water from birth.

Single-Cell Suspension Procedures. Spleens and LNs were mechanically dissociated, homogenized, and passed through a nylon cell strainer (BD Falcon) in 5% (vol/vol) FCS and 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) in PBS. For adoptive transfer, RPMI 1640 Glutamax (Gibco) supplemented with 10% (vol/vol) FCS (Biochrom) was used instead. Cutaneous metastases were mechanically dissociated and digested with 1 mg/mL collagenase D and 0.1 mg/mL DNase I (Roche) for 25 min at 37 °C. For skin suspensions, ears were collected and split in

dorsal and ventral lobes. Lobes were cut in small parts and digested with 0.4 mg/mL liberase, 0.05 mg/mL collagenase D, and 0.1 mg/mL DNase I (Roche).

Cell-Surface Staining and Flow Cytometry. Surface staining was performed by incubating cells on ice, for 15 min, with Abs in 5% (vol/vol) FCS (Biochrom) and 0.1% NaN₃ (Sigma-Aldrich) in PBS. Each cell-staining reaction was preceded by a 15-min incubation with a purified anti-CD16/32 Ab (FcγRII/III block; 2.4G2) obtained from hybridoma supernatant followed by labeling with specific Abs. Multicolor immunofluorescence was analyzed using a LSR2 cytometer (BD Biosciences). Data files were analyzed using Diva software (BD Biosciences). Data acquisition was performed on the Cochin Cytometry and Immunobiology facility. For skin suspensions, incubation with Live/Dead Blue stain (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol, was performed before Ab staining.

Adoptive Transfer of CD4⁺ T Cells. Cervical LNs and spleen cells were incubated on ice for 20 min with a mixture of anti-CD8 (53-6.7), anti-CD11b (Mac-1), and anti-CD19 (1D3) Abs, obtained from hybridoma supernatants, and then with magnetic beads coupled to anti-rat immunoglobulins (DynaL Biotech). Purified CD4⁺ T cells (5 × 10⁶ cells; 95–97% pure) were injected intraperitoneally into RetCD3ε^{KO} mice 5 d after birth.

Antibody Titration by Flow Cytometry. Sera from MT/ret and RetCD3ε^{KO} mice were obtained following intracardiac blood collection. Melan-ret cells (a cell

line derived from a cutaneous metastases of a MT/ret mouse) and LLCs (American Type Culture Collection) were incubated with purified anti-CD16/32 Ab and then incubated with the sera. Cells were labeled with Alexa 488-conjugated Goat anti-mouse κ Ab (GAM) from Invitrogen. Cells submitted to the same protocol, but without serum incubation, were used as control.

Statistics. Data are expressed as means ± SEM. The significance of differences between two series of results was assessed using the Student's unpaired *t* test. The significance of differences between three or more series of results was assessed using the one-way ANOVA, and comparison between sets of results was assessed using Tukey posttest. Comparison between incidence curves was performed using log-rank test. Correlation analyses were performed using Pearson's correlation test. (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001). All statistical analyses were performed using Prism 5 software (GraphPad).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the Cochin Cytometry and Immunobiology and Animal Core facilities and, in particular, C. Lapert and O. Le Gall for animal care. We thank S. Kaveri for critical review of the manuscript. This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer and the Association pour la Recherche contre le Cancer, A.P. and A. Delpoux were supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer, and A.A. was supported by a master fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3):1151–1164.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609):1057–1061.
- North RJ, Bursucker I (1984) Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1+2+ effector T cells. *J Exp Med* 159(5):1295–1311.
- Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163(10):5211–5218.
- Antony PA, et al. (2005) CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 174(5):2591–2601.
- Chaput N, et al. (2007) Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. *J Immunol* 179(8):4969–4978.
- Darrasse-Jèze G, et al. (2009) Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J Clin Invest* 119(9):2648–2662.
- Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Allison JP (2011) Shifting the equilibrium in cancer immunotherapy: From tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev* 241(1):104–118.
- Boissonnas A, et al. (2010) Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 32(2):266–278.
- Fujimura T, Ring S, Umansky V, Mahnke K, Enk AH (2012) Regulatory T cells stimulate B7-H1 expression in myeloid-derived suppressor cells in ret melanomas. *J Invest Dermatol* 132(4):1239–1246.
- Kato M, et al. (1998) Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 17(14):1885–1888.
- Eyles J, et al. (2010) Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J Clin Invest* 120(6):2030–2039.
- Toh B, et al. (2011) Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol* 9(9):e1001162.
- Lengagne R, et al. (2004) Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: Role of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Res* 64(4):1496–1501.
- Bystryn JC, Rigel D, Friedman R, Kopf A (1987) Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma. *Arch Dermatol* 123(8):1053–1055.
- Duhra P, Ilchysyn A (1991) Prolonged survival in metastatic malignant melanoma associated with vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 16(4):303–305.
- Quaglino P, et al. (2010) Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: Results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Ann Oncol* 21(2):409–414.
- Byrne KT, Turk MJ (2011) New perspectives on the role of vitiligo in immune responses to melanoma. *Oncotarget* 2(9):684–694.
- Viguier M, et al. (2004) Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173(2):1444–1453.
- Jacobs JF, Nierkens S, Figdor CG, de Vries IJ, Adema GJ (2012) Regulatory T cells in melanoma: The final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol* 13(1):e32–e42.
- Lengagne R, et al. (2011) T cells contribute to tumor progression by favoring pro-tumoral properties of intra-tumoral myeloid cells in a mouse model for spontaneous melanoma. *PLoS ONE* 6(5):e20235.
- Lengagne R, et al. (2008) Distinct role for CD8 T cells toward cutaneous tumors and visceral metastases. *J Immunol* 180(1):130–137.
- Sandoval-Cruz M, et al. (2011) Immunopathogenesis of vitiligo. *Autoimmun Rev* 10(12):762–765.
- Serbina NV, Pamer EG (2006) Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7(3):311–317.
- Soudja SM, et al. (2010) Tumor-initiated inflammation overrides protective adaptive immunity in an induced melanoma model in mice. *Cancer Res* 70(9):3515–3525.
- Bronkhorst IH, Jager MJ (2012) Uveal melanoma: The inflammatory microenvironment. *J Innate Immun* 4(5-6):454–462.
- Piras F, et al. (2005) The predictive value of CD8, CD4, CD68, and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* 104(6):1246–1254.
- Varney ML, Johansson SL, Singh RK (2005) Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: Role of monocyte chemoattractant protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. *Melanoma Res* 15(5):417–425.
- Nizar S, Meyer B, Galustian C, Kumar D, Dalgleish A (2010) T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1806(1):7–17.
- Kimpfner S, et al. (2009) Skin melanoma development in ret transgenic mice despite the depletion of CD25+Foxp3+ regulatory T cells in lymphoid organs. *J Immunol* 183(10):6330–6337.
- Ben Ahmed M, et al. (2012) Functional defects of peripheral regulatory T lymphocytes in patients with progressive vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res* 25(1):99–109.
- Klarquist J, et al. (2010) Reduced skin homing by functional Treg in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res* 23(2):276–286.
- Lili Y, et al. (2012) Global activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes correlates with an impairment in regulatory T cells in patients with generalized vitiligo. *PLoS ONE* 7(5):e37513.
- Le Gal FA, et al. (2001) Direct evidence to support the role of antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma-associated vitiligo. *J Invest Dermatol* 117(6):1464–1470.
- Ogg GS, Rod Dunbar P, Romero P, Chen JL, Cerundolo V (1998) High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *J Exp Med* 188(6):1203–1208.
- Byrne KT, et al. (2011) Autoimmune melanocyte destruction is required for robust CD8+ memory T cell responses to mouse melanoma. *J Clin Invest* 121(5):1797–1809.
- Auffray C, et al. (2009) CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206(3):595–606.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27:669–692.
- te Velde AA, Figdor CG (1992) Monocyte mediated cytotoxic activity against melanoma. *Melanoma Res* 1(5-6):303–309.
- Griffith TS, et al. (1999) Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 189(8):1343–1354.
- Martin JH, Edwards SW (1993) Changes in mechanisms of monocyte/macrophage-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity, whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. *J Immunol* 150(8 Pt 1):3478–3486.
- Rubtsov YP, et al. (2008) Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28(4):546–558.
- Boschaerts T, et al. (2010) Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling. *PLoS Pathog* 6(8):e1001045.
- Qian BZ, et al. (2011) CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475(7355):222–225.
- Lesokhin AM, et al. (2012) Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res* 72(4):876–886.
- Wolf MJ, et al. (2012) Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell* 22(1):91–105.

BIBLIOGRAPHIE

Akl, A., Jones, N.D., Rogers, N., Bakr, M.A., Mostafa, A., El Shehawy el, M., Ghoneim, M.A., and Wood, K.J. (2008). An investigation to assess the potential of CD25^{high}CD4⁺ T cells to regulate responses to donor alloantigens in clinically stable renal transplant recipients. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 21, 65-73.

Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hammerling, G.J., and Arnold, B. (1998). Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* 282, 1338-1341.

Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., and Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature immunology* 5, 266-271.

Anderson, C.F., Lira, R., Kamhawi, S., Belkaid, Y., Wynn, T.A., and Sacks, D. (2008). IL-10 and TGF-beta control the establishment of persistent and transmissible infections produced by *Leishmania tropica* in C57BL/6 mice. *J Immunol* 180, 4090-4097.

Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298, 1395-1401.

Andersson, J., Stefanova, I., Stephens, G.L., and Shevach, E.M. (2007). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are activated in vivo by recognition of self. *International immunology* 19, 557-566.

Antov, A., Yang, L., Vig, M., Baltimore, D., and Van Parijs, L. (2003). Essential role for STAT5 signaling in CD25⁺CD4⁺ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. *J Immunol* 171, 3435-3441.

Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nature immunology* 3, 756-763.

Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *The Journal of experimental medicine* 184, 387-396.

Aschenbrenner, K., D'Cruz, L.M., Vollmann, E.H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L.K., Rolink, A., and Klein, L. (2007). Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nature immunology* 8, 351-358.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* 190, 995-1004.

Aswad, F., Kawamura, H., and Dennert, G. (2005). High sensitivity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol* 175, 3075-3083.

Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., *et al.* (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232-236.

Azukizawa, H., Dohler, A., Kanazawa, N., Nayak, A., Lipp, M., Malissen, B., Autenrieth, I., Katayama, I., Riemann, M., Weih, F., *et al.* (2011). Steady state migratory RelB⁺ langerin⁺ dermal dendritic cells mediate peripheral induction of antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *European journal of immunology* 41, 1420-1434.

Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T., and Hirai, H. (2003). Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer research* 63, 4516-4520.

Azzam, H.S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E.W., and Love, P.E. (1998). CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *The Journal of experimental medicine* 188, 2301-2311.

Baban, B., Chandler, P.R., Sharma, M.D., Pihkala, J., Koni, P.A., Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2009). IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *J Immunol* 183, 2475-2483.

Balandina, A., Lecart, S., Darteville, P., Saoudi, A., and Berrih-Aknin, S. (2005). Functional defect of regulatory CD4(+)CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 105, 735-741.

Baldwin, T.A., Sandau, M.M., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2005). The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection. *The Journal of experimental medicine* 202, 111-121.

Banz, A., Peixoto, A., Pontoux, C., Cordier, C., Rocha, B., and Papiernik, M. (2003). A unique subpopulation of CD4⁺ regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *European journal of immunology* 33, 2419-2428.

Banz, A., Pontoux, C., and Papiernik, M. (2002). Modulation of Fas-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. *J Immunol* 169, 750-757.

Bar-On, L., Birnberg, T., Kim, K.W., and Jung, S. (2011). Dendritic cell-restricted CD80/86 deficiency results in peripheral regulatory T-cell reduction but is not associated with lymphocyte hyperactivation. *European journal of immunology* 41, 291-298.

Barnes, M.J., Krebs, P., Harris, N., Eidenschenk, C., Gonzalez-Quintial, R., Arnold, C.N., Crozat, K., Sovath, S., Moresco, E.M., Theofilopoulos, A.N., *et al.* (2009). Commitment to the regulatory T cell lineage requires CARMA1 in the thymus but not in the periphery. *PLoS biology* 7, e51.

Battaglia, M., and Roncarolo, M.G. (2011). Immune intervention with T regulatory cells: past lessons and future perspectives for type 1 diabetes. *Seminars in immunology* 23, 182-194.

Battaglia, M., Stabilini, A., Migliavacca, B., Horejs-Hoeck, J., Kaupper, T., and Roncarolo, M.G. (2006). Rapamycin promotes expansion of functional CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 177, 8338-8347.

Bayer, A.L., Yu, A., and Malek, T.R. (2007). Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 178, 4062-4071.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation,

polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 27, 20-21.

Bensinger, S.J., Bandeira, A., Jordan, M.S., Caton, A.J., and Laufer, T.M. (2001). Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 194, 427-438.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

Beyer, M., Thabet, Y., Muller, R.U., Sadlon, T., Classen, S., Lahl, K., Basu, S., Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Krebs, W., *et al.* (2011). Repression of the genome organizer SATB1 in regulatory T cells is required for suppressive function and inhibition of effector differentiation. *Nature immunology* 12, 898-907.

Bhandoola, A., Tai, X., Eckhaus, M., Auchincloss, H., Mason, K., Rubin, S.A., Carbone, K.M., Grossman, Z., Rosenberg, A.S., and Singer, A. (2002). Peripheral expression of self-MHC-II influences the reactivity and self-tolerance of mature CD4(+) T cells: evidence from a lymphopenic T cell model. *Immunity* 17, 425-436.

Bienvenu, B., Martin, B., Auffray, C., Cordier, C., Becourt, C., and Lucas, B. (2005). Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol* 175, 246-253.

Bilate, A.M., and Lafaille, J.J. (2012). Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annual review of immunology* 30, 733-758.

Boissonnas, A., Scholer-Dahirel, A., Simon-Blancal, V., Pace, L., Valet, F., Kissenpfennig, A., Sparwasser, T., Malissen, B., Fetler, L., and Amigorena, S. (2010). Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 32, 266-278.

Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A.H., and von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nature immunology* 7, 1092-1100.

Bonertz, A., Weitz, J., Pietsch, D.H., Rahbari, N.N., Schlude, C., Ge, Y., Juenger, S., Vlodavsky, I., Khazaie, K., Jaeger, D., *et al.* (2009). Antigen-specific Tregs control T cell responses against a limited repertoire of tumor antigens in patients with colorectal carcinoma. *The Journal of clinical investigation* 119, 3311-3321.

Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmethofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., *et al.* (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* 204, 1303-1310.

Bopp, T., Dehzad, N., Reuter, S., Klein, M., Ullrich, N., Stassen, M., Schild, H., Buhl, R., Schmitt, E., and Taube, C. (2009). Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression. *J Immunol* 182, 4017-4024.

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., *et al.* (2007). Expression of

ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225-1232.

Bouillet, P., and O'Reilly, L.A. (2009). CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nature reviews. Immunology* 9, 514-519.

Bradley, L.M., Asensio, V.C., Schioetz, L.K., Harbertson, J., Krah, T., Patstone, G., Woolf, N., Campbell, I.L., and Sarvetnick, N. (1999). Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol* 162, 2511-2520.

Brincks, E.L., Roberts, A.D., Cookenham, T., Sell, S., Kohlmeier, J.E., Blackman, M.A., and Woodland, D.L. (2013). Antigen-specific memory regulatory CD4⁺Foxp3⁺ T cells control memory responses to influenza virus infection. *J Immunol* 190, 3438-3446.

Brinster, C., and Shevach, E.M. (2008). Costimulatory effects of IL-1 on the expansion/differentiation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ T cells. *Journal of leukocyte biology* 84, 480-487.

Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guinter, T.I., Yamashita, Y., Sharrow, S.O., and Singer, A. (2000). Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4⁺8⁺ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8⁺ T cells. *Immunity* 13, 59-71.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paep, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics* 27, 68-73.

Brunstein, C.G., Miller, J.S., Cao, Q., McKenna, D.H., Hippen, K.L., Curtsinger, J., Defor, T., Levine, B.L., June, C.H., Rubinstein, P., *et al.* (2011). Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 117, 1061-1070.

Buckner, J.H. (2010). Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature reviews. Immunology* 10, 849-859.

Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.W., Vegoe, A.L., Hsieh, C.S., Jenkins, M.K., and Farrar, M.A. (2008). Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28, 112-121.

Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 178, 280-290.

Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A.C., Mages, H.W., Lam, K.P., Coyle, A.J., Krocze, R.A., and Hutloff, A. (2008). ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* 180, 774-782.

Burnet, F.M. (1969). Self and Not-self.

Cantor, H., and Boyse, E.A. (1975). Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *The Journal of experimental medicine* 141, 1376-1389.

- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27, 635-646.
- Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M., and Demengeot, J. (2003). Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* 197, 403-411.
- Carpenter, A.C., and Bosselut, R. (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nature immunology* 11, 666-673.
- Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R.N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* 440, 890-895.
- Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European journal of immunology* 30, 1538-1543.
- Chappert, P., Leboeuf, M., Rameau, P., Lalfer, M., Desbois, S., Liblau, R.S., Danos, O., Davoust, J.M., and Gross, D.A. (2010). Antigen-specific Treg impair CD8⁺ T-cell priming by blocking early T-cell expansion. *European journal of immunology* 40, 339-350.
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326, 986-991.
- Chen, A., Liu, S., Park, D., Kang, Y., and Zheng, G. (2007a). Depleting intratumoral CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells via FasL protein transfer enhances the therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer. *Cancer research* 67, 1291-1298.
- Chen, T., Darrasse-Jeze, G., Bergot, A.S., Courau, T., Churlaud, G., Valdivia, K., Strominger, J.L., Ruocco, M.G., Chaouat, G., and Klatzmann, D. (2013a). Self-specific memory regulatory T cells protect embryos at implantation in mice. *J Immunol* 191, 2273-2281.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198, 1875-1886.
- Chen, W., Liang, X., Peterson, A.J., Munn, D.H., and Blazar, B.R. (2008a). The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 181, 5396-5404.
- Chen, W., Zhou, D., Torrealba, J.R., Waddell, T.K., Grant, D., and Zhang, L. (2005). Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells. *J Immunol* 175, 3409-3416.
- Chen, X., Baumel, M., Mannel, D.N., Howard, O.M., and Oppenheim, J.J. (2007b). Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 179, 154-161.
- Chen, X., and Oppenheim, J.J. (2010). TNF-alpha: an activator of CD4⁺FoxP3⁺TNFR2⁺ regulatory T cells. *Current directions in autoimmunity* 11, 119-134.

- Chen, X., and Oppenheim, J.J. (2011). Resolving the identity myth: key markers of functional CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *International immunopharmacology* 11, 1489-1496.
- Chen, X., Subleski, J.J., Kopf, H., Howard, O.M., Mannel, D.N., and Oppenheim, J.J. (2008b). Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol* 180, 6467-6471.
- Chen, X., Wu, X., Zhou, Q., Howard, O.M., Netea, M.G., and Oppenheim, J.J. (2013b). TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol* 190, 1076-1084.
- Chen, Y., Shen, S., Gorentla, B.K., Gao, J., and Zhong, X.P. (2012). Murine regulatory T cells contain hyperproliferative and death-prone subsets with differential ICOS expression. *J Immunol* 188, 1698-1707.
- Choi, B.K., Bae, J.S., Choi, E.M., Kang, W.J., Sakaguchi, S., Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (2004). 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4⁺CD25⁺ T cells. *Journal of leukocyte biology* 75, 785-791.
- Chong, M.M., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y., and Littman, D.R. (2008). The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *The Journal of experimental medicine* 205, 2005-2017.
- Chopra, M., Riedel, S.S., Biehl, M., Krieger, S., von Krosigk, V., Bauerlein, C.A., Brede, C., Jordan Garrote, A.L., Kraus, S., Schafer, V., *et al.* (2013). Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis. *Carcinogenesis* 34, 1296-1303.
- Chougnet, C.A., Tripathi, P., Lages, C.S., Raynor, J., Sholl, A., Fink, P., Plas, D.R., and Hildeman, D.A. (2011). A major role for Bim in regulatory T cell homeostasis. *J Immunol* 186, 156-163.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X.H., *et al.* (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nature medicine* 17, 983-988.
- Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S.E., Benoist, C., and Mathis, D. (2012). PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486, 549-553.
- Cobbold, S.P., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., and Waldmann, H. (2004). Induction of foxP3⁺ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 172, 6003-6010.
- Cohen, W.M., Pouvelle-Moratille, S., Wang, X.F., Farci, S., Munier, G., Charron, D., Menez, A., Busson, M., and Maillere, B. (2006). Scanning the HIV genome for CD4⁺ T cell epitopes restricted to HLA-DP4, the most prevalent HLA class II molecule. *J Immunol* 176, 5401-5408.
- Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., *et al.* (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature immunology* 11, 1093-1101.

- Collison, L.W., Pillai, M.R., Chaturvedi, V., and Vignali, D.A. (2009). Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 182, 6121-6128.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-569.
- Contento, R.L., Molon, B., Boullaran, C., Pozzan, T., Manes, S., Marullo, S., and Viola, A. (2008). CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10101-10106.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 204, 1757-1764.
- Coquet, J.M., Ribot, J.C., Babala, N., Middendorp, S., van der Horst, G., Xiao, Y., Neves, J.F., Fonseca-Pereira, D., Jacobs, H., Pennington, D.J., *et al.* (2013). Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4+Foxp3+ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. *The Journal of experimental medicine* 210, 715-728.
- Cowan, J.E., Parnell, S.M., Nakamura, K., Caamano, J.H., Lane, P.J., Jenkinson, E.J., Jenkinson, W.E., and Anderson, G. (2013). The thymic medulla is required for Foxp3+ regulatory but not conventional CD4+ thymocyte development. *The Journal of experimental medicine* 210, 675-681.
- Cozzo, C., Larkin, J., 3rd, and Caton, A.J. (2003). Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 5678-5682.
- Crellin, N.K., Garcia, R.V., Hadisfar, O., Allan, S.E., Steiner, T.S., and Levings, M.K. (2005). Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 175, 8051-8059.
- Cretney, E., Kallies, A., and Nutt, S.L. (2013). Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends in immunology* 34, 74-80.
- Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., and Kallies, A. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nature immunology* 12, 304-311.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* 10, 942-949.
- Daniely, D., Kern, J., Cebula, A., and Ignatowicz, L. (2010). Diversity of TCRs on natural Foxp3+ T cells in mice lacking Aire expression. *J Immunol* 184, 6865-6873.
- Darrasse-Jeze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K.H., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 206, 1853-1862.

Davey, G.M., Kurts, C., Miller, J.F., Bouillet, P., Strasser, A., Brooks, A.G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002). Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *The Journal of experimental medicine* 196, 947-955.

Davidson, T.S., and Shevach, E.M. (2011). Polyclonal Treg cells modulate T effector cell trafficking. *European journal of immunology* 41, 2862-2870.

de Goer de Herve, M.G., Jaafoura, S., Vallee, M., and Taoufik, Y. (2012). FoxP3(+) regulatory CD4 T cells control the generation of functional CD8 memory. *Nature communications* 3, 986.

de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *European journal of immunology* 34, 2480-2488.

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., *et al.* (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* 204, 1257-1265.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature immunology* 2, 1032-1039.

Di Ianni, M., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Castellino, F., Bonifacio, E., Del Papa, B., Zei, T., Ostini, R.I., Cecchini, D., *et al.* (2011). Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 117, 3921-3928.

Dimova, T., Nagaeva, O., Stenqvist, A.C., Hedlund, M., Kjellberg, L., Strand, M., Dehlin, E., and Mincheva-Nilsson, L. (2011). Maternal Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD4+ CD25- regulatory T-cell populations are enriched in human early normal pregnancy decidua: a phenotypic study of paired decidual and peripheral blood samples. *Am J Reprod Immunol* 66 Suppl 1, 44-56.

Donskoy, E., and Goldschneider, I. (2003). Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit the adult mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J Immunol* 170, 3514-3521.

Duarte, J.H., Zelenay, S., Bergman, M.L., Martins, A.C., and Demengeot, J. (2009). Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *European journal of immunology* 39, 948-955.

Dujardin, H.C., Buren-Defranoux, O., Boucontet, L., Vieira, P., Cumano, A., and Bandeira, A. (2004). Regulatory potential and control of Foxp3 expression in newborn CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14473-14478.

Edinger, M., and Hoffmann, P. (2011). Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Current opinion in immunology* 23, 679-684.

Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *The Journal of experimental medicine* 200, 277-285.

- Elpek, K.G., Yolcu, E.S., Franke, D.D., Lacelle, C., Schabowsky, R.H., and Shirwan, H. (2007). Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J Immunol* 179, 7295-7304.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S. (2004). Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *International immunology* 16, 1769-1780.
- Feng, T., Cao, A.T., Weaver, C.T., Elson, C.O., and Cong, Y. (2011). Interleukin-12 converts Foxp3+ regulatory T cells to interferon-gamma-producing Foxp3+ T cells that inhibit colitis. *Gastroenterology* 140, 2031-2043.
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., and Mathis, D. (2009a). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature medicine* 15, 930-939.
- Feuerer, M., Hill, J.A., Mathis, D., and Benoist, C. (2009b). Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nature immunology* 10, 689-695.
- Filaci, G., Fenoglio, D., and Indiveri, F. (2011). CD8(+) T regulatory/suppressor cells and their relationships with autoreactivity and autoimmunity. *Autoimmunity* 44, 51-57.
- Fischer, U.B., Jacovetty, E.L., Medeiros, R.B., Goudy, B.D., Zell, T., Swanson, J.B., Lorenz, E., Shimizu, Y., Miller, M.J., Khoruts, A., and Ingulli, E. (2007). MHC class II deprivation impairs CD4 T cell motility and responsiveness to antigen-bearing dendritic cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 7181-7186.
- Fisson, S., Darrasse-Jeze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R., and Salomon, B.L. (2003). Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *The Journal of experimental medicine* 198, 737-746.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., *et al.* (2007). Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS biology* 5, e38.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 330-336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005a). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology* 6, 1142-1151.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005b). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329-341.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., *et al.* (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* 192, 1027-1034.
- Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews. Cancer* 12, 298-306.

Fritzsching, B., Oberle, N., Eberhardt, N., Quick, S., Haas, J., Wildemann, B., Krammer, P.H., and Suri-Payer, E. (2005). In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol* 175, 32-36.

Fu, G., Chen, Y., Yu, M., Podd, A., Schuman, J., He, Y., Di, L., Yassai, M., Haribhai, D., North, P.E., *et al.* (2010). Phospholipase C γ 1 is essential for T cell development, activation, and tolerance. *The Journal of experimental medicine* 207, 309-318.

Fujimoto, M., Nakano, M., Terabe, F., Kawahata, H., Ohkawara, T., Han, Y., Ripley, B., Serada, S., Nishikawa, T., Kimura, A., *et al.* (2011). The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 186, 32-40.

Furtado, G.C., Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J.J. (2002). Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *The Journal of experimental medicine* 196, 851-857.

Gagliani, N., Magnani, C.F., Huber, S., Gianolini, M.E., Pala, M., Licona-Limon, P., Guo, B., Herbert, D.R., Bulfone, A., Trentini, F., *et al.* (2013). Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature medicine* 19, 739-746.

Gapin, L. (2010). iNKT cell autoreactivity: what is 'self' and how is it recognized? *Nature reviews. Immunology* 10, 272-277.

Garin, M.I., Chu, C.C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R., and Lechler, R.I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109, 2058-2065.

Gasteiger, G., Hemmers, S., Bos, P.D., Sun, J.C., and Rudensky, A.Y. (2013a). IL-2-dependent adaptive control of NK cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine* 210, 1179-1187.

Gasteiger, G., Hemmers, S., Firth, M.A., Le Floch, A., Huse, M., Sun, J.C., and Rudensky, A.Y. (2013b). IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 210, 1167-1178.

Gavin, M.A., Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A., and Rudensky, A. (2002). Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nature immunology* 3, 33-41.

Gavin, M.A., Rasmussen, J.P., Fontenot, J.D., Vasta, V., Manganiello, V.C., Beavo, J.A., and Rudensky, A.Y. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445, 771-775.

Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews. Immunology* 2, 309-322.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723-737.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21, 903-914.

- Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., *et al.* (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *The Journal of experimental medicine* 202, 1075-1085.
- Glisic-Milosavljevic, S., Waukau, J., Jailwala, P., Jana, S., Khoo, H.J., Albertz, H., Woodliff, J., Koppen, M., Alemzadeh, R., Hagopian, W., and Ghosh, S. (2007). At-risk and recent-onset type 1 diabetic subjects have increased apoptosis in the CD4+CD25+ T-cell fraction. *PloS one* 2, e146.
- Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174, 1783-1786.
- Gottschalk, R.A., Corse, E., and Allison, J.P. (2010). TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *The Journal of experimental medicine* 207, 1701-1711.
- Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 29, 464-475.
- Gratz, I.K., Truong, H.A., Yang, S.H., Maurano, M.M., Lee, K., Abbas, A.K., and Rosenblum, M.D. (2013). Cutting Edge: memory regulatory t cells require IL-7 and not IL-2 for their maintenance in peripheral tissues. *J Immunol* 190, 4483-4487.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192.
- Grinberg-Bleyer, Y., Saadoun, D., Baeyens, A., Billiard, F., Goldstein, J.D., Gregoire, S., Martin, G.H., Elhage, R., Derian, N., Carpentier, W., *et al.* (2010). Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *The Journal of clinical investigation* 120, 4558-4568.
- Griseri, T., Asquith, M., Thompson, C., and Powrie, F. (2010). OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. *The Journal of experimental medicine* 207, 699-709.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Gupta, S., Manicassamy, S., Vasu, C., Kumar, A., Shang, W., and Sun, Z. (2008). Differential requirement of PKC-theta in the development and function of natural regulatory T cells. *Molecular immunology* 46, 213-224.
- Hahn, B.H., Singh, R.P., La Cava, A., and Ebling, F.M. (2005). Tolerogenic treatment of lupus mice with consensus peptide induces Foxp3-expressing, apoptosis-resistant, TGFbeta-secreting CD8+ T cell suppressors. *J Immunol* 175, 7728-7737.
- Hamano, R., Huang, J., Yoshimura, T., Oppenheim, J.J., and Chen, X. (2011). TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40. *European journal of immunology* 41, 2010-2020.

- Haque, A., Best, S.E., Amante, F.H., Mustafah, S., Desbarrieres, L., de Labastida, F., Sparwasser, T., Hill, G.R., and Engwerda, C.R. (2010). CD4⁺ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo. *PLoS pathogens* 6, e1001221.
- Hickman, H.D., Li, L., Reynoso, G.V., Rubin, E.J., Skon, C.N., Mays, J.W., Gibbs, J., Schwartz, O., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2011). Chemokines control naive CD8⁺ T cell selection of optimal lymph node antigen presenting cells. *The Journal of experimental medicine* 208, 2511-2524.
- Hill, J.A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D., and Benoist, C. (2007). Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27, 786-800.
- Hindley, J.P., Ferreira, C., Jones, E., Lauder, S.N., Ladell, K., Wynn, K.K., Betts, G.J., Singh, Y., Price, D.A., Godkin, A.J., *et al.* (2011). Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating conventional and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors. *Cancer research* 71, 736-746.
- Hinterberger, M., Aichinger, M., Prazeres da Costa, O., Voehringer, D., Hoffmann, R., and Klein, L. (2010). Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nature immunology* 11, 512-519.
- Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Klein, L. (2011). B7/CD28 in central tolerance: costimulation promotes maturation of regulatory T cell precursors and prevents their clonal deletion. *Frontiers in immunology* 2, 30.
- Hochweller, K., Wabnitz, G.H., Samstag, Y., Suffner, J., Hammerling, G.J., and Garbi, N. (2010). Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5931-5936.
- Hoechst, B., Gamrekelashvili, J., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2011). Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood* 117, 6532-6541.
- Hogquist, K.A., and Moran, A.E. (2009). Treg cells meet their limit. *Nature immunology* 10, 565-566.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Housley, W.J., Adams, C.O., Nichols, F.C., Puddington, L., Lingenheld, E.G., Zhu, L., Rajan, T.V., and Clark, R.B. (2011). Natural but not inducible regulatory T cells require TNF- α signaling for in vivo function. *J Immunol* 186, 6779-6787.
- Hsieh, C.S., Lee, H.M., and Lio, C.W. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature reviews. Immunology* 12, 157-167.
- Hsieh, C.S., Liang, Y., Tyznik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity* 21, 267-277.

Hsieh, C.S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nature immunology* 7, 401-410.

Hu, D., Ikizawa, K., Lu, L., Sanchirico, M.E., Shinohara, M.L., and Cantor, H. (2004). Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nature immunology* 5, 516-523.

Huang, B., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., and Chen, S.H. (2006). Gr-1⁺CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research* 66, 1123-1131.

Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., *et al.* (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21, 503-513.

Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., Koch-Nolte, F., Boyer, O., Seman, M., and Adriouch, S. (2010). Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *The Journal of experimental medicine* 207, 2561-2568.

Huehn, J., Polansky, J.K., and Hamann, A. (2009). Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature reviews. Immunology* 9, 83-89.

Hugues, S., Scholer, A., Boissonnas, A., Nussbaum, A., Combadiere, C., Amigorena, S., and Fetler, L. (2007). Dynamic imaging of chemokine-dependent CD8⁺ T cell help for CD8⁺ T cell responses. *Nature immunology* 8, 921-930.

Humblet, C., Rudensky, A., and Kyewski, B. (1994). Presentation and intercellular transfer of self antigen within the thymic microenvironment: expression of the E alpha peptide-I-Ab complex by isolated thymic stromal cells. *International immunology* 6, 1949-1958.

Ikeda, T., Hirata, S., Fukushima, S., Matsunaga, Y., Ito, T., Uchino, M., Nishimura, Y., and Senju, S. (2010). Dual effects of TRAIL in suppression of autoimmunity: the inhibition of Th1 cells and the promotion of regulatory T cells. *J Immunol* 185, 5259-5267.

Ishida, T., Ishii, T., Inagaki, A., Yano, H., Komatsu, H., Iida, S., Inagaki, H., and Ueda, R. (2006). Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer research* 66, 5716-5722.

Isomura, I., Palmer, S., Grumont, R.J., Bunting, K., Hoyne, G., Wilkinson, N., Banerjee, A., Proietto, A., Gugasyan, R., Wu, L., *et al.* (2009). c-Rel is required for the development of thymic Foxp3⁺ CD4 regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 206, 3001-3014.

Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 165, 302-319.

Ji, H.B., Liao, G., Faubion, W.A., Abadia-Molina, A.C., Cozzo, C., Laroux, F.S., Caton, A., and Terhorst, C. (2004). Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J Immunol* 172, 5823-5827.

- Jiang, H., Zhang, S.I., and Pernis, B. (1992). Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256, 1213-1215.
- Johanns, T.M., Ertelt, J.M., Rowe, J.H., and Way, S.S. (2010). Regulatory T cell suppressive potency dictates the balance between bacterial proliferation and clearance during persistent *Salmonella* infection. *PLoS pathogens* 6, e1001043.
- Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Holenbeck, A.E., Lerman, M.A., Naji, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature immunology* 2, 301-306.
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.F., and Rudensky, A.Y. (2012a). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology* 30, 531-564.
- Josefowicz, S.Z., Niec, R.E., Kim, H.Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D.T., and Rudensky, A.Y. (2012b). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* 482, 395-399.
- Kallies, A., Hawkins, E.D., Belz, G.T., Metcalf, D., Hommel, M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2006). Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nature immunology* 7, 466-474.
- Kapp, J.A., Honjo, K., Kapp, L.M., Xu, X., Cozier, A., and Bucy, R.P. (2006). TCR transgenic CD8⁺ T cells activated in the presence of TGFβ express FoxP3 and mediate linked suppression of primary immune responses and cardiac allograft rejection. *International immunology* 18, 1549-1562.
- Kapp, J.A., Pierce, C.W., Webb, D.R., Devens, B., Godfrey, W., Fukuse, S., Engleman, E., Lake, J.P., Magnani, J.I., Maiti, P.K., and et al. (1995). Characterization of the epitope recognized by a mAb that reacts differentially with murine suppressor T cells. *International immunology* 7, 1319-1330.
- Kerdiles, Y.M., Stone, E.L., Beisner, D.R., McGargill, M.A., Ch'en, I.L., Stockmann, C., Katayama, C.D., and Hedrick, S.M. (2010). Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity* 33, 890-904.
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nature immunology* 4, 337-342.
- Khong, H.T., and Restifo, N.P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature immunology* 3, 999-1005.
- Kim, G.Y., Ligons, D.L., Hong, C., Luckey, M.A., Keller, H.R., Tai, X., Lucas, P.J., Gress, R.E., and Park, J.H. (2012). An in vivo IL-7 requirement for peripheral Foxp3⁺ regulatory T cell homeostasis. *J Immunol* 188, 5859-5866.
- Kim, H.J., Wang, X., Radfar, S., Sproule, T.J., Roopenian, D.C., and Cantor, H. (2011a). CD8⁺ T regulatory cells express the Ly49 Class I MHC receptor and are defective in autoimmune prone B6-Yaa mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 2010-2015.
- Kim, H.P., and Leonard, W.J. (2007). CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *The Journal of experimental medicine* 204, 1543-1551.

- Kim, J.K., Klinger, M., Benjamin, J., Xiao, Y., Erle, D.J., Littman, D.R., and Killeen, N. (2009). Impact of the TCR signal on regulatory T cell homeostasis, function, and trafficking. *PloS one* 4, e6580.
- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., and Rudensky, A.Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature immunology* 8, 191-197.
- Kim, Y.H., Choi, B.K., Shin, S.M., Kim, C.H., Oh, H.S., Park, S.H., Lee, D.G., Lee, M.J., Kim, K.H., Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (2011b). 4-1BB triggering ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating the balance between Th17 and regulatory T cells. *J Immunol* 187, 1120-1128.
- King, C., Davies, J., Mueller, R., Lee, M.S., Krah, T., Yeung, B., O'Connor, E., and Sarvetnick, N. (1998). TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. *Immunity* 8, 601-613.
- Kingsley, C.I., Karim, M., Bushell, A.R., and Wood, K.J. (2002). CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168, 1080-1086.
- Kinoshita, M., Kayama, H., Kusu, T., Yamaguchi, T., Kunisawa, J., Kiyono, H., Sakaguchi, S., and Takeda, K. (2012). Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon. *J Immunol* 189, 2869-2878.
- Kitamura, K., Farber, J.M., and Kelsall, B.L. (2010). CCR6 marks regulatory T cells as a colon-tropic, IL-10-producing phenotype. *J Immunol* 185, 3295-3304.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature reviews. Immunology* 9, 833-844.
- Klein, L., and Jovanovic, K. (2011). Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Seminars in immunology* 23, 401-409.
- Kleinewietfeld, M., Puentes, F., Borsellino, G., Battistini, L., Rotzschke, O., and Falk, K. (2005). CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood* 105, 2877-2886.
- Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature immunology* 10, 595-602.
- Koh, D.R., Fung-Leung, W.P., Ho, A., Gray, D., Acha-Orbea, H., and Mak, T.W. (1992). Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/- mice. *Science* 256, 1210-1213.
- Komatsu, N., Mariotti-Ferrandiz, M.E., Wang, Y., Malissen, B., Waldmann, H., and Hori, S. (2009). Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1903-1908.
- Kornete, M., Sgouroudis, E., and Piccirillo, C.A. (2012). ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3+ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice. *J Immunol* 188, 1064-1074.

Koyama, I., Nadazdin, O., Boskovic, S., Ochiai, T., Smith, R.N., Sykes, M., Sogawa, H., Murakami, T., Strom, T.B., Colvin, R.B., *et al.* (2007). Depletion of CD8 memory T cells for induction of tolerance of a previously transplanted kidney allograft. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, 1055-1061.

Krangel, M.S. (2009). Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Current opinion in immunology* 21, 133-139.

Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine* 182, 459-465.

Kubo, T., Hatton, R.D., Oliver, J., Liu, X., Elson, C.O., and Weaver, C.T. (2004). Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J Immunol* 173, 7249-7258.

Kunisawa, J., Hashimoto, E., Ishikawa, I., and Kiyono, H. (2012). A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo. *PloS one* 7, e32094.

Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., and Sakaguchi, S. (2000). Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *International immunology* 12, 1145-1155.

Kursar, M., Koch, M., Mittrucker, H.W., Nouailles, G., Bonhagen, K., Kamradt, T., and Kaufmann, S.H. (2007). Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 178, 2661-2665.

Kurts, C., Miller, J.F., Subramaniam, R.M., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (1998). Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *The Journal of experimental medicine* 188, 409-414.

Kwon, B.S., Hurtado, J.C., Lee, Z.H., Kwack, K.B., Seo, S.K., Choi, B.K., Koller, B.H., Wolisi, G., Broxmeyer, H.E., and Vinay, D.S. (2002). Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice. *J Immunol* 168, 5483-5490.

Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M., and Tonegawa, S. (1994). High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* 78, 399-408.

Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *The Journal of experimental medicine* 204, 57-63.

Lane, P., Haller, C., and McConnell, F. (1996). Evidence that induction of tolerance in vivo involves active signaling via a B7 ligand-dependent mechanism: CTLA4-Ig protects V beta 8+ T cells from tolerance induction by the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *European journal of immunology* 26, 858-862.

Lanteri, M.C., O'Brien, K.M., Purtha, W.E., Cameron, M.J., Lund, J.M., Owen, R.E., Heitman, J.W., Custer, B., Hirschhorn, D.F., Tobler, L.H., *et al.* (2009). Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 3266-3277.

- Lanzavecchia, A. (1990). Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annual review of immunology* 8, 773-793.
- Lathrop, S.K., Bloom, S.M., Rao, S.M., Nutsch, K., Lio, C.W., Santacruz, N., Peterson, D.A., Stappenbeck, T.S., and Hsieh, C.S. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478, 250-254.
- Lathrop, S.K., Santacruz, N.A., Pham, D., Luo, J., and Hsieh, C.S. (2008). Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population. *The Journal of experimental medicine* 205, 3105-3117.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., *et al.* (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26, 371-381.
- Le Campion, A., Pommier, A., Delpoux, A., Stouvenel, L., Auffray, C., Martin, B., and Lucas, B. (2012). IL-2 and IL-7 determine the homeostatic balance between the regulatory and conventional CD4⁺ T cell compartments during peripheral T cell reconstitution. *J Immunol* 189, 3339-3346.
- Lechner, O., Lauber, J., Franzke, A., Sarukhan, A., von Boehmer, H., and Buer, J. (2001). Fingerprints of anergic T cells. *Current biology : CB* 11, 587-595.
- Lee, H.M., and Hsieh, C.S. (2009). Rare development of Foxp3⁺ thymocytes in the CD4⁺CD8⁺ subset. *J Immunol* 183, 2261-2266.
- Lee, J.H., Wang, L.C., Lin, Y.T., Yang, Y.H., Lin, D.T., and Chiang, B.L. (2006). Inverse correlation between CD4⁺ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 117, 280-286.
- Lee, Y.H., Ishida, Y., Rifa'i, M., Shi, Z., Isobe, K., and Suzuki, H. (2008). Essential role of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180, 825-832.
- Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyra, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., and Hamann, A. (2002). Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13031-13036.
- Lehuen, A., Lantz, O., Beaudoin, L., Laloux, V., Carnaud, C., Bendelac, A., Bach, J.F., and Monteiro, R.C. (1998). Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *The Journal of experimental medicine* 188, 1831-1839.
- Leishman, A.J., Gapin, L., Capone, M., Palmer, E., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2002). Precursors of functional MHC class I- or class II-restricted CD8alphaalpha(+) T cells are positively selected in the thymus by agonist self-peptides. *Immunity* 16, 355-364.
- Li, J., Park, J., Foss, D., and Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *The Journal of experimental medicine* 206, 607-622.

- Li, M.O., Sanjabi, S., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25, 455-471.
- Li, Q., Shakya, A., Guo, X., Zhang, H., Tantin, D., Jensen, P.E., and Chen, X. (2012). Constitutive nuclear localization of NFAT in Foxp3⁺ regulatory T cells independent of calcineurin activity. *J Immunol* 188, 4268-4277.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., *et al.* (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 180, 5916-5926.
- Lider, O., Santos, L.M., Lee, C.S., Higgins, P.J., and Weiner, H.L. (1989). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 142, 748-752.
- Lin, W., Haribhai, D., Relland, L.M., Truong, N., Carlson, M.R., Williams, C.B., and Chatila, T.A. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nature immunology* 8, 359-368.
- Lindley, S., Dayan, C.M., Bishop, A., Roep, B.O., Peakman, M., and Tree, T.I. (2005). Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54, 92-99.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., *et al.* (2011). Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nature medicine* 17, 975-982.
- Lio, C.W., Dodson, L.F., Deppong, C.M., Hsieh, C.S., and Green, J.M. (2010). CD28 facilitates the generation of Foxp3(-) cytokine responsive regulatory T cell precursors. *J Immunol* 184, 6007-6013.
- Lio, C.W., and Hsieh, C.S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28, 100-111.
- Lio, C.W., and Hsieh, C.S. (2011). Becoming self-aware: the thymic education of regulatory T cells. *Current opinion in immunology* 23, 213-219.
- Liston, A., Farr, A.G., Chen, Z., Benoist, C., Mathis, D., Manley, N.R., and Rudensky, A.Y. (2007). Lack of Foxp3 function and expression in the thymic epithelium. *The Journal of experimental medicine* 204, 475-480.
- Liston, A., Lu, L.F., O'Carroll, D., Tarakhovsky, A., and Rudensky, A.Y. (2008a). Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *The Journal of experimental medicine* 205, 1993-2004.
- Liston, A., Nutsch, K.M., Farr, A.G., Lund, J.M., Rasmussen, J.P., Koni, P.A., and Rudensky, A.Y. (2008b). Differentiation of regulatory Foxp3⁺ T cells in the thymic cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11903-11908.
- Liu, B., Tahk, S., Yee, K.M., Fan, G., and Shuai, K. (2010). The ligase PIAS1 restricts natural regulatory T cell differentiation by epigenetic repression. *Science* 330, 521-525.

- Liu, H., Komai-Koma, M., Xu, D., and Liew, F.Y. (2006). Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7048-7053.
- Liu, V.C., Wong, L.Y., Jang, T., Shah, A.H., Park, I., Yang, X., Zhang, Q., Lonning, S., Teicher, B.A., and Lee, C. (2007). Tumor evasion of the immune system by converting CD4⁺CD25⁻ T cells into CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF- β . *J Immunol* 178, 2883-2892.
- Lohr, J., Knoechel, B., Kahn, E.C., and Abbas, A.K. (2004). Role of B7 in T cell tolerance. *J Immunol* 173, 5028-5035.
- Long, M., Park, S.G., Strickland, I., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2009). Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 31, 921-931.
- Lu, L.F., Boldin, M.P., Chaudhry, A., Lin, L.L., Taganov, K.D., Hanada, T., Yoshimura, A., Baltimore, D., and Rudensky, A.Y. (2010). Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142, 914-929.
- Lu, L.F., Thai, T.H., Calado, D.P., Chaudhry, A., Kubo, M., Tanaka, K., Loeb, G.B., Lee, H., Yoshimura, A., Rajewsky, K., and Rudensky, A.Y. (2009). Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 30, 80-91.
- Lund, J.M., Hsing, L., Pham, T.T., and Rudensky, A.Y. (2008). Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 320, 1220-1224.
- Lyssuk, E.Y., Torgashina, A.V., Soloviev, S.K., Nasonov, E.L., and Bykovskaia, S.N. (2007). Reduced number and function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Advances in experimental medicine and biology* 601, 113-119.
- Magg, T., Mannert, J., Ellwart, J.W., Schmid, I., and Albert, M.H. (2012). Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *European journal of immunology* 42, 1627-1638.
- Maillard, I., Fang, T., and Pear, W.S. (2005). Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annual review of immunology* 23, 945-974.
- Malchow, S., Leventhal, D.S., Nishi, S., Fischer, B.I., Shen, L., Paner, G.P., Amit, A.S., Kang, C., Geddes, J.E., Allison, J.P., *et al.* (2013). Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science* 339, 1219-1224.
- Maldonado, R.A., and von Andrian, U.H. (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Advances in immunology* 108, 111-165.
- Malek, T.R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., and Kong, L. (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R β -deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17, 167-178.

- Mandl, J.N., Monteiro, J.P., Vrisekoop, N., and Germain, R.N. (2013). T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity* 38, 263-274.
- Mantel, P.Y., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C.B. (2006). Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176, 3593-3602.
- Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., and Rudensky, A.Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 201, 1061-1067.
- Marie, J.C., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 25, 441-454.
- Marks, B.R., Nowyhed, H.N., Choi, J.Y., Poholek, A.C., Odegard, J.M., Flavell, R.A., and Craft, J. (2009). Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nature immunology* 10, 1125-1132.
- Marrack, P., Scott-Browne, J.P., Dai, S., Gapin, L., and Kappler, J.W. (2008). Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annual review of immunology* 26, 171-203.
- Martin-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbi, A.L., and Toribio, M.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 115, 5366-5375.
- Martin, B., Auffray, C., Delpoux, A., Pommier, A., Durand, A., Charvet, C., Yakonowsky, P., de Boysson, H., Bonilla, N., Audemard, A., *et al.* (2013). Highly self-reactive naive CD4 T cells are prone to differentiate into regulatory T cells. *Nature communications* 4, 2209.
- Martin, B., Becourt, C., Bienvenu, B., and Lucas, B. (2006). Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4+ T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood* 108, 270-277.
- Martin, B., Bourgeois, C., Dautigny, N., and Lucas, B. (2003). On the role of MHC class II molecules in the survival and lymphopenia-induced proliferation of peripheral CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6021-6026.
- Martinez-Llordella, M., Puig-Pey, I., Orlando, G., Ramoni, M., Tisone, G., Rimola, A., Lerut, J., Latinne, D., Margarit, C., Bilbao, I., *et al.* (2007). Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, 309-319.
- Martins, G.A., Cimmino, L., Shapiro-Shelef, M., Szabolcs, M., Herron, A., Magnusdottir, E., and Calame, K. (2006). Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nature immunology* 7, 457-465.
- Matarese, G., Carrieri, P.B., La Cava, A., Perna, F., Sanna, V., De Rosa, V., Aufiero, D., Fontana, S., and Zappacosta, S. (2005). Leptin increase in multiple sclerosis associates with

reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5150-5155.

Mathis, D., and Benoist, C. (2009). Aire. *Annual review of immunology* 27, 287-312.

Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 12, 991-1045.

Mazzucchelli, R., Hixon, J.A., Spolski, R., Chen, X., Li, W.Q., Hall, V.L., Willette-Brown, J., Hurwitz, A.A., Leonard, W.J., and Durum, S.K. (2008). Development of regulatory T cells requires IL-7R α stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 112, 3283-3292.

McCaughy, T.M., Baldwin, T.A., Wilken, M.S., and Hogquist, K.A. (2008). Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *The Journal of experimental medicine* 205, 2575-2584.

McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M., and Byrne, M.C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323.

Medoff, B.D., Sandall, B.P., Landry, A., Nagahama, K., Mizoguchi, A., Luster, A.D., and Xavier, R.J. (2009). Differential requirement for CARMA1 in agonist-selected T-cell development. *European journal of immunology* 39, 78-84.

Meloni, F., Vitulo, P., Bianco, A.M., Paschetto, E., Morosini, M., Cascina, A., Mazzucchelli, I., Ciardelli, L., Oggionni, T., Fietta, A.M., *et al.* (2004). Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* 77, 762-766.

Menager-Marcq, I., Pomie, C., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P. (2006). CD8+CD28-regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology* 131, 1775-1785.

Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J., and Bradfield, C.A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* 185, 3190-3198.

Miellot, A., Zhu, R., Diem, S., Boissier, M.C., Herbelin, A., and Bessis, N. (2005). Activation of invariant NK T cells protects against experimental rheumatoid arthritis by an IL-10-dependent pathway. *European journal of immunology* 35, 3704-3713.

Miller, A., Lider, O., Roberts, A.B., Sporn, M.B., and Weiner, H.L. (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 421-425.

Millet, V., Naquet, P., and Guinamard, R.R. (2008). Intercellular MHC transfer between thymic epithelial and dendritic cells. *European journal of immunology* 38, 1257-1263.

Miyao, T., Floess, S., Setoguchi, R., Luche, H., Fehling, H.J., Waldmann, H., Huehn, J., and Hori, S. (2012). Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* 36, 262-275.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., *et al.* (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30, 899-911.

Molinero, L.L., Yang, J., Gajewski, T., Abraham, C., Farrar, M.A., and Alegre, M.L. (2009). CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 182, 6736-6743.

Molitor-Dart, M.L., Andrassy, J., Kwun, J., Kayaoglu, H.A., Roenneburg, D.A., Haynes, L.D., Torrealba, J.R., Bobadilla, J.L., Sollinger, H.W., Knechtle, S.J., and Burlingham, W.J. (2007). Developmental exposure to noninherited maternal antigens induces CD4⁺ T regulatory cells: relevance to mechanism of heart allograft tolerance. *J Immunol* 179, 6749-6761.

Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gomez-Mouton, C., Lanzavecchia, A., Martinez, A.C., Manes, S., and Viola, A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. *Nature immunology* 6, 465-471.

Moran, A.E., Holzapfel, K.L., Xing, Y., Cunningham, N.R., Maltzman, J.S., Punt, J., and Hogquist, K.A. (2011). T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *The Journal of experimental medicine* 208, 1279-1289.

Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature reviews. Immunology* 7, 610-621.

Morlacchi, S., Dal Secco, V., Soldani, C., Glaichenhaus, N., Viola, A., and Sarukhan, A. (2011). Regulatory T cells target chemokine secretion by dendritic cells independently of their capacity to regulate T cell proliferation. *J Immunol* 186, 6807-6814.

Mouly, E., Chemin, K., Nguyen, H.V., Chopin, M., Mesnard, L., Leite-de-Moraes, M., Burlen-defranoux, O., Bandeira, A., and Bories, J.C. (2010). The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 207, 2113-2125.

Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J., and Curotto de Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *The Journal of clinical investigation* 115, 1923-1933.

Myers, L., Croft, M., Kwon, B.S., Mittler, R.S., and Vella, A.T. (2005). Peptide-specific CD8 T regulatory cells use IFN-gamma to elaborate TGF-beta-based suppression. *J Immunol* 174, 7625-7632.

Myers, L., Takahashi, C., Mittler, R.S., Rossi, R.J., and Vella, A.T. (2003). Effector CD8 T cells possess suppressor function after 4-1BB and Toll-like receptor triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5348-5353.

Nadkarni, S., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2007). Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *The Journal of experimental medicine* 204, 33-39.

Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J., Lalioti, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., *et al.* (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nature genetics* 17, 393-398.

- Nagar, M., Jacob-Hirsch, J., Vernitsky, H., Berkun, Y., Ben-Horin, S., Amariglio, N., Bank, I., Kloog, Y., Rechavi, G., and Goldstein, I. (2010). TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J Immunol* 184, 3570-3581.
- Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine* 194, 629-644.
- Nakano, A., Watanabe, M., Iida, T., Kuroda, S., Matsuzuka, F., Miyauchi, A., and Iwatani, Y. (2007). Apoptosis-induced decrease of intrathyroidal CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 17, 25-31.
- Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N., and Klein, L. (2008). Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455, 396-400.
- Nie, H., Zheng, Y., Li, R., Guo, T.B., He, D., Fang, L., Liu, X., Xiao, L., Chen, X., Wan, B., *et al.* (2013). Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. *Nature medicine* 19, 322-328.
- Nishikawa, H., Kato, T., Tanida, K., Hiasa, A., Tawara, I., Ikeda, H., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Kronenberg, M., Nakayama, T., *et al.* (2003). CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 10902-10906.
- Nutt, S.L., and Kee, B.L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26, 715-725.
- Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., *et al.* (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nature immunology* 7, 652-662.
- Ochando, J.C., Yopp, A.C., Yang, Y., Garin, A., Li, Y., Boros, P., Llodra, J., Ding, Y., Lira, S.A., Krieger, N.R., and Bromberg, J.S. (2005). Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 174, 6993-7005.
- Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., *et al.* (2012). T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 37, 785-799.
- Ohkura, N., and Sakaguchi, S. (2011). Maturation of effector regulatory T cells. *Nature immunology* 12, 283-284.
- Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E.A., Hall, J.A., Chou, D., Dos Santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., *et al.* (2009). Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 31, 772-786.
- Olivares-Villagomez, D., Wang, Y., and Lafaille, J.J. (1998). Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic

mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 188, 1883-1894.

Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. (2008). Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10113-10118.

Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer research* 59, 3128-3133.

Orihara, K., Narita, M., Tobe, T., Akasawa, A., Ohya, Y., Matsumoto, K., and Saito, H. (2007). Circulating Foxp3⁺CD4⁺ cell numbers in atopic patients and healthy control subjects. *The Journal of allergy and clinical immunology* 120, 960-962.

Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., and Li, M.O. (2010). Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 32, 642-653.

Ouyang, W., Liao, W., Luo, C.T., Yin, N., Huse, M., Kim, M.V., Peng, M., Chan, P., Ma, Q., Mo, Y., *et al.* (2012). Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature* 491, 554-559.

Pace, L., Tempez, A., Arnold-Schrauf, C., Lemaitre, F., Bousso, P., Fetler, L., Sparwasser, T., and Amigorena, S. (2012). Regulatory T cells increase the avidity of primary CD8⁺ T cell responses and promote memory. *Science* 338, 532-536.

Pacholczyk, R., Kern, J., Singh, N., Iwashima, M., Kraj, P., and Ignatowicz, L. (2007). Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunity* 27, 493-504.

Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bicciato, S., *et al.* (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature immunology* 12, 870-878.

Pandiyani, P., Conti, H.R., Zheng, L., Peterson, A.C., Mathern, D.R., Hernandez-Santos, N., Edgerton, M., Gaffen, S.L., and Lenardo, M.J. (2011). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity* 34, 422-434.

Pandiyani, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nature immunology* 8, 1353-1362.

Patton, D.T., Garden, O.A., Pearce, W.P., Clough, L.E., Monk, C.R., Leung, E., Rowan, W.C., Sancho, S., Walker, L.S., Vanhaesebroeck, B., and Okkenhaug, K. (2006). Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110delta is critical for the function of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 177, 6598-6602.

Patton, D.T., Wilson, M.D., Rowan, W.C., Soond, D.R., and Okkenhaug, K. (2011). The PI3K p110delta regulates expression of CD38 on regulatory T cells. *PloS one* 6, e17359.

Paust, S., and Cantor, H. (2005). Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunological reviews* 204, 195-207.

Peng, G., Guo, Z., Kiniwa, Y., Voo, K.S., Peng, W., Fu, T., Wang, D.Y., Li, Y., Wang, H.Y., and Wang, R.F. (2005). Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function. *Science* 309, 1380-1384.

Picca, C.C., Oh, S., Panarey, L., Aitken, M., Basehoar, A., and Caton, A.J. (2009). Thymocyte deletion can bias Treg formation toward low-abundance self-peptide. *European journal of immunology* 39, 3301-3306.

Piccirillo, C.A., and Shevach, E.M. (2001). Cutting edge: control of CD8⁺ T cell activation by CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167, 1137-1140.

Pierson, W., Cauwe, B., Policheni, A., Schlenner, S.M., Franckaert, D., Berges, J., Humblet-Baron, S., Schonefeldt, S., Herold, M.J., Hildeman, D., *et al.* (2013). Antiapoptotic Mcl-1 is critical for the survival and niche-filling capacity of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nature immunology* 14, 959-965.

Poitrasson-Riviere, M., Bienvenu, B., Le Campion, A., Becourt, C., Martin, B., and Lucas, B. (2008). Regulatory CD4⁺ T cells are crucial for preventing CD8⁺ T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* 180, 7294-7304.

Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., and Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European journal of immunology* 38, 1654-1663.

Polansky, J.K., Schreiber, L., Thelemann, C., Ludwig, L., Kruger, M., Baumgrass, R., Cording, S., Floess, S., Hamann, A., and Huehn, J. (2010). Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *J Mol Med (Berl)* 88, 1029-1040.

Pomie, C., Menager-Marcq, I., and van Meerwijk, J.P. (2008). Murine CD8⁺ regulatory T lymphocytes: the new era. *Human immunology* 69, 708-714.

Pommier, A., Audemard, A., Durand, A., Lengagne, R., Delpoux, A., Martin, B., Douguet, L., Le Campion, A., Kato, M., Avril, M.F., *et al.* (2013). Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4⁺ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 13085-13090.

Poussier, P., Ning, T., Banerjee, D., and Julius, M. (2002). A unique subset of self-specific intraintestinal T cells maintains gut integrity. *The Journal of experimental medicine* 195, 1491-1497.

Powrie, F., and Mason, D. (1990). OX-22high CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *The Journal of experimental medicine* 172, 1701-1708.

Priatel, J.J., Utting, O., and Teh, H.S. (2001). TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J Immunol* 167, 6188-6194.

Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., *et al.* (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600-603.

Rao, S., Gerondakis, S., Woltring, D., and Shannon, M.F. (2003). c-Rel is required for chromatin remodeling across the IL-2 gene promoter. *J Immunol* 170, 3724-3731.

Rausch, S., Huehn, J., Loddenkemper, C., Hepworth, M.R., Klotz, C., Sparwasser, T., Hamann, A., Lucius, R., and Hartmann, S. (2009). Establishment of nematode infection despite increased Th2 responses and immunopathology after selective depletion of Foxp3+ cells. *European journal of immunology* 39, 3066-3077.

Ray, A., Basu, S., Williams, C.B., Salzman, N.H., and Dittel, B.N. (2012). A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J Immunol* 188, 3188-3198.

Read, S., Malmstrom, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* 192, 295-302.

Reardon, C., Wang, A., and McKay, D.M. (2008). Transient local depletion of Foxp3+ regulatory T cells during recovery from colitis via Fas/Fas ligand-induced death. *J Immunol* 180, 8316-8326.

Redpath, S.A., van der Werf, N., Cervera, A.M., MacDonald, A.S., Gray, D., Maizels, R.M., and Taylor, M.D. (2013). ICOS controls Foxp3(+) regulatory T-cell expansion, maintenance and IL-10 production during helminth infection. *European journal of immunology* 43, 705-715.

Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., and Wang, Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell death and differentiation* 14, 2076-2084.

Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I., and Suzuki, H. (2004). Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine* 200, 1123-1134.

Rowe, J.H., Ertelt, J.M., Aguilera, M.N., Farrar, M.A., and Way, S.S. (2011). Foxp3(+) regulatory T cell expansion required for sustaining pregnancy compromises host defense against prenatal bacterial pathogens. *Cell host & microbe* 10, 54-64.

Rowe, J.H., Ertelt, J.M., and Way, S.S. (2012a). Foxp3(+) regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection. *Immunology* 136, 1-10.

Rowe, J.H., Ertelt, J.M., Xin, L., and Way, S.S. (2012b). Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature* 490, 102-106.

Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C.A., Bonelli, M., Sciume, G., Zare, H., Vahedi, G., Dema, B., *et al.* (2013). BACH2 represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis. *Nature* 498, 506-510.

Ruan, Q., Kameswaran, V., Tone, Y., Li, L., Liou, H.C., Greene, M.I., Tone, M., and Chen, Y.H. (2009). Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* 31, 932-940.

Rubtsov, Y.P., Niec, R.E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., and Rudensky, A.Y. (2010). Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* 329, 1667-1671.

Sainz-Perez, A., Lim, A., Lemercier, B., and Leclerc, C. (2012). The T-cell receptor repertoire of tumor-infiltrating regulatory T lymphocytes is skewed toward public sequences. *Cancer research* 72, 3557-3569.

Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine* 161, 72-87.

Sakaguchi, S., Takahashi, T., and Nishizuka, Y. (1982a). Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *The Journal of experimental medicine* 156, 1577-1586.

Sakaguchi, S., Takahashi, T., and Nishizuka, Y. (1982b). Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *The Journal of experimental medicine* 156, 1565-1576.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.

Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431-440.

Samstein, R.M., Josefowicz, S.Z., Arvey, A., Treuting, P.M., and Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 150, 29-38.

Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28, 402-413.

Schmidt-Supprian, M., Tian, J., Grant, E.P., Pasparakis, M., Maehr, R., Ovaa, H., Ploegh, H.L., Coyle, A.J., and Rajewsky, K. (2004). Differential dependence of CD4⁺CD25⁺ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4566-4571.

Scott-Browne, J.P., Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Ishida-Tsubota, K., Fontenot, J.D., Rudensky, A.Y., Bevan, M.J., and Urdahl, K.B. (2007). Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 204, 2159-2169.

Selvaraj, R.K., and Geiger, T.L. (2007). A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol* 179, 11 p following 1390.

Seo, N., Hayakawa, S., Takigawa, M., and Tokura, Y. (2001). Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4⁺ T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology* 103, 449-457.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of experimental medicine* 201, 723-735.

Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Kariyone, A., Takatsu, K., and Urdahl, K.B. (2010). Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 207, 1409-1420.

Sharma, M.D., Hou, D.Y., Baban, B., Koni, P.A., He, Y., Chandler, P.R., Blazar, B.R., Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2010). Reprogrammed foxp3(+) regulatory T cells provide essential help to support cross-presentation and CD8(+) T cell priming in naive mice. *Immunity* 33, 942-954.

Sharma, S., Yang, S.C., Zhu, L., Reckamp, K., Gardner, B., Baratelli, F., Huang, M., Batra, R.K., and Dubinett, S.M. (2005). Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer research* 65, 5211-5220.

Shevach, E.M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25, 195-201.

Shih, F.F., Mandik-Nayak, L., Wipke, B.T., and Allen, P.M. (2004). Massive thymic deletion results in systemic autoimmunity through elimination of CD4+ CD25+ T regulatory cells. *The Journal of experimental medicine* 199, 323-335.

Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163, 5211-5218.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature immunology* 3, 135-142.

Shimoda, M., Mmanywa, F., Joshi, S.K., Li, T., Miyake, K., Pihkala, J., Abbas, J.A., and Koni, P.A. (2006). Conditional ablation of MHC-II suggests an indirect role for MHC-II in regulatory CD4 T cell maintenance. *J Immunol* 176, 6503-6511.

Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., and et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-699.

Silverstein, A.M. (2001). Autoimmunity versus horror autotoxicus: the struggle for recognition. *Nature immunology* 2, 279-281.

Simonetta, F., Chiali, A., Cordier, C., Urrutia, A., Girault, I., Bloquet, S., Tanchot, C., and Bourgeois, C. (2010). Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *European journal of immunology* 40, 2528-2538.

Simonetta, F., Gestermann, N., Martinet, K.Z., Boniotto, M., Tissieres, P., Seddon, B., and Bourgeois, C. (2012). Interleukin-7 influences FOXP3+CD4+ regulatory T cells peripheral homeostasis. *PloS one* 7, e36596.

- Singer, A., Adoro, S., and Park, J.H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nature reviews. Immunology* 8, 788-801.
- Singer, G.G., and Abbas, A.K. (1994). The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1, 365-371.
- Singh, R.P., La Cava, A., and Hahn, B.H. (2008). pConsensus peptide induces tolerogenic CD8+ T cells in lupus-prone (NZB x NZW)F1 mice by differentially regulating Foxp3 and PD1 molecules. *J Immunol* 180, 2069-2080.
- Singh, R.P., La Cava, A., Wong, M., Ebling, F., and Hahn, B.H. (2007). CD8+ T cell-mediated suppression of autoimmunity in a murine lupus model of peptide-induced immune tolerance depends on Foxp3 expression. *J Immunol* 178, 7649-7657.
- Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly, Y.M., Glickman, J.N., and Garrett, W.S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 341, 569-573.
- Smyth, M.J., Teng, M.W., Swann, J., Kyparissoudis, K., Godfrey, D.I., and Hayakawa, Y. (2006). CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* 176, 1582-1587.
- Spence, P.J., and Green, E.A. (2008). Foxp3+ regulatory T cells promiscuously accept thymic signals critical for their development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 973-978.
- Steeg, C., Adler, G., Sparwasser, T., Fleischer, B., and Jacobs, T. (2009). Limited role of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 183, 7014-7022.
- Stefanova, I., Dorfman, J.R., and Germain, R.N. (2002). Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420, 429-434.
- Steger, U., Kingsley, C.I., Karim, M., Bushell, A.R., and Wood, K.J. (2006). CD25+CD4+ regulatory T cells develop in mice not only during spontaneous acceptance of liver allografts but also after acute allograft rejection. *Transplantation* 82, 1202-1209.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* 21, 685-711.
- Stephens, G.L., McHugh, R.S., Whitters, M.J., Young, D.A., Luxenberg, D., Carreno, B.M., Collins, M., and Shevach, E.M. (2004). Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 173, 5008-5020.
- Strauss, L., Bergmann, C., and Whiteside, T.L. (2009). Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 182, 1469-1480.
- Stritesky, G.L., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2012). Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annual review of immunology* 30, 95-114.

- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
- Sugita, S., Ng, T.F., Lucas, P.J., Gress, R.E., and Streilein, J.W. (2006). B7+ iris pigment epithelium induce CD8+ T regulatory cells; both suppress CTLA-4+ T cells. *J Immunol* 176, 118-127.
- Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine* 204, 1775-1785.
- Sutmoller, R.P., den Brok, M.H., Kramer, M., Bennink, E.J., Toonen, L.W., Kullberg, B.J., Joosten, L.A., Akira, S., Netea, M.G., and Adema, G.J. (2006). Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* 116, 485-494.
- Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C.D., Lee, S., and Rouse, B.T. (2003). CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *The Journal of experimental medicine* 198, 889-901.
- Taams, L.S., Smith, J., Rustin, M.H., Salmon, M., Poulter, L.W., and Akbar, A.N. (2001). Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *European journal of immunology* 31, 1122-1131.
- Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nature immunology* 6, 152-162.
- Tai, X., Van Laethem, F., Pobezinsky, L., Guintier, T., Sharrow, S.O., Adams, A., Granger, L., Kruhlak, M., Lindsten, T., Thompson, C.B., *et al.* (2012). Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood* 119, 5155-5163.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine* 192, 303-310.
- Takeda, I., Ine, S., Killeen, N., Ndhlovu, L.C., Murata, K., Satomi, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2004). Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol* 172, 3580-3589.
- Tan, M.C., Goedegebuure, P.S., Belt, B.A., Flaherty, B., Sankpal, N., Gillanders, W.E., Eberlein, T.J., Hsieh, C.S., and Linehan, D.C. (2009). Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* 182, 1746-1755.
- Tan, W., Zhang, W., Strasner, A., Grivennikov, S., Cheng, J.Q., Hoffman, R.M., and Karin, M. (2011). Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature* 470, 548-553.
- Tanaka, S., Maeda, S., Hashimoto, M., Fujimori, C., Ito, Y., Teradaira, S., Hirota, K., Yoshitomi, H., Katakai, T., Shimizu, A., *et al.* (2010). Graded attenuation of TCR signaling

elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function. *J Immunol* 185, 2295-2305.

Tang, Q., Adams, J.Y., Penaranda, C., Melli, K., Piaggio, E., Sgouroudis, E., Piccirillo, C.A., Salomon, B.L., and Bluestone, J.A. (2008). Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 28, 687-697.

Tang, Q., and Bluestone, J.A. (2008). The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature immunology* 9, 239-244.

Tang, Q., Henriksen, K.J., Boden, E.K., Tooley, A.J., Ye, J., Subudhi, S.K., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Bluestone, J.A. (2003). Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 3348-3352.

Tang, X., Maricic, I., and Kumar, V. (2007). Anti-TCR antibody treatment activates a novel population of nonintestinal CD8 alpha alpha⁺ TCR alpha beta⁺ regulatory T cells and prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178, 6043-6050.

Tao, R., de Zoeten, E.F., Ozkaynak, E., Chen, C., Wang, L., Porrett, P.M., Li, B., Turka, L.A., Olson, E.N., Greene, M.I., *et al.* (2007). Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nature medicine* 13, 1299-1307.

Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine* 188, 287-296.

Tischner, D., Gaggli, I., Peschel, I., Kaufmann, M., Tuzlak, S., Drach, M., Thuille, N., Villunger, A., and Jan Wieggers, G. (2012). Defective cell death signalling along the Bcl-2 regulated apoptosis pathway compromises Treg cell development and limits their functionality in mice. *Journal of autoimmunity* 38, 59-69.

Toker, A., and Huehn, J. (2011). To be or not to be a Treg cell: lineage decisions controlled by epigenetic mechanisms. *Science signaling* 4, pe4.

Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature immunology* 9, 194-202.

Tonkin, D.R., and Haskins, K. (2009). Regulatory T cells enter the pancreas during suppression of type 1 diabetes and inhibit effector T cells and macrophages in a TGF-beta-dependent manner. *European journal of immunology* 39, 1313-1322.

Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juscinska, J., Dobyszek, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Mysliwska, J., and Hellmann, A. (2009). First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4⁺CD25⁺CD127⁺ T regulatory cells. *Clin Immunol* 133, 22-26.

Tsai, S., Clemente-Casares, X., and Santamaria, P. (2011). CD8(+) Tregs in autoimmunity: learning "self"-control from experience. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 3781-3795.

Tsitoura, D.C., Yeung, V.P., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2002). Critical role of B cells in the development of T cell tolerance to aeroallergens. *International immunology* 14, 659-667.

Tullius, S.G., Nieminen, M., Bechstein, W.O., Jonas, S., Steinmuller, T., Pratschke, J., Zeilinger, K., Graser, E., Volk, H.D., and Neuhaus, P. (1997). Chronically rejected rat kidney allografts induce donor-specific tolerance. *Transplantation* 64, 158-161.

Turk, M.J., Guevara-Patino, J.A., Rizzuto, G.A., Engelhorn, M.E., Sakaguchi, S., and Houghton, A.N. (2004). Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 200, 771-782.

Vaeth, M., Gogishvili, T., Bopp, T., Klein, M., Berberich-Siebelt, F., Gattenloehner, S., Avots, A., Sparwasser, T., Grebe, N., Schmitt, E., *et al.* (2011). Regulatory T cells facilitate the nuclear accumulation of inducible cAMP early repressor (ICER) and suppress nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 2480-2485.

Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E.M., and Lipsky, P.E. (2006). TNF downmodulates the function of human CD4+CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood* 108, 253-261.

Valzasina, B., Guiducci, C., Dislich, H., Killeen, N., Weinberg, A.D., and Colombo, M.P. (2005). Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood* 105, 2845-2851.

van der Aar, A.M., Sibiryak, D.S., Bakdash, G., van Capel, T.M., van der Kleij, H.P., Opstelten, D.J., Teunissen, M.B., Kapsenberg, M.L., and de Jong, E.C. (2011). Vitamin D3 targets epidermal and dermal dendritic cells for induction of distinct regulatory T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127, 1532-1540 e1537.

van Mierlo, G.J., Scherer, H.U., Hameetman, M., Morgan, M.E., Flierman, R., Huizinga, T.W., and Toes, R.E. (2008). Cutting edge: TNFR-shedding by CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators. *J Immunol* 180, 2747-2751.

van Santen, H.M., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* 200, 1221-1230.

Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L., and Farrar, M.A. (2008). IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* 181, 3285-3290.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.

Vence, L., Palucka, A.K., Fay, J.W., Ito, T., Liu, Y.J., Banchereau, J., and Ueno, H. (2007). Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20884-20889.

Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 199, 971-979.

- Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology* 8, 523-532.
- Vocanson, M., Rozieres, A., Hennino, A., Poyet, G., Gaillard, V., Renaudineau, S., Achachi, A., Benetiere, J., Kaiserlian, D., Dubois, B., and Nicolas, J.F. (2010). Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 126, 280-289, 289 e281-287.
- von Andrian, U.H., and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature reviews. Immunology* 3, 867-878.
- Vu, M.D., Xiao, X., Gao, W., Degauque, N., Chen, M., Kroemer, A., Killeen, N., Ishii, N., and Li, X.C. (2007). OX40 costimulation turns off Foxp3⁺ Tregs. *Blood* 110, 2501-2510.
- Walker, L.S., and Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nature reviews. Immunology* 2, 11-19.
- Walunas, T.L., Bakker, C.Y., and Bluestone, J.A. (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *The Journal of experimental medicine* 183, 2541-2550.
- Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2005). Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5126-5131.
- Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445, 766-770.
- Wang, H.Y., Lee, D.A., Peng, G., Guo, Z., Li, Y., Kiniwa, Y., Shevach, E.M., and Wang, R.F. (2004). Tumor-specific human CD4⁺ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* 20, 107-118.
- Wang, W., Lau, R., Yu, D., Zhu, W., Korman, A., and Weber, J. (2009). PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4⁺ CD25(Hi) regulatory T cells. *International immunology* 21, 1065-1077.
- Wang, X., Zheng, J., Liu, J., Yao, J., He, Y., Li, X., Yu, J., Yang, J., Liu, Z., and Huang, S. (2005). Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients. *European journal of haematology* 75, 468-476.
- Wang, Y., Kissenpfennig, A., Mingueneau, M., Richelme, S., Perrin, P., Chevrier, S., Genton, C., Lucas, B., DiSanto, J.P., Acha-Orbea, H., *et al.* (2008). Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 180, 1565-1575.
- Wang, Y., Su, M.A., and Wan, Y.Y. (2011). An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. *Immunity* 35, 337-348.
- Wei, S., Kryczek, I., and Zou, W. (2006). Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 108, 426-431.
- Weiss, E.M., Schmidt, A., Vobis, D., Garbi, N., Lahl, K., Mayer, C.T., Sparwasser, T., Ludwig, A., Suri-Payer, E., Oberle, N., and Krammer, P.H. (2011). Foxp3-mediated

suppression of CD95L expression confers resistance to activation-induced cell death in regulatory T cells. *J Immunol* 187, 1684-1691.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 322, 271-275.

Wohlfert, E.A., Grainger, J.R., Bouladoux, N., Konkel, J.E., Oldenhove, G., Ribeiro, C.H., Hall, J.A., Yagi, R., Naik, S., Bhairavabhotla, R., *et al.* (2011). GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 4503-4515.

Wong, J., Mathis, D., and Benoist, C. (2007). TCR-based lineage tracing: no evidence for conversion of conventional into regulatory T cells in response to a natural self-antigen in pancreatic islets. *The Journal of experimental medicine* 204, 2039-2045.

Wood, K.J., Bushell, A., and Hester, J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. *Nature reviews. Immunology* 12, 417-430.

Wood, K.J., Bushell, A., and Jones, N.D. (2011). Immunologic unresponsiveness to alloantigen in vivo: a role for regulatory T cells. *Immunological reviews* 241, 119-132.

Workman, C.J., Szymczak-Workman, A.L., Collison, L.W., Pillai, M.R., and Vignali, D.A. (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66, 2603-2622.

Xiao, X., Gong, W., Demirci, G., Liu, W., Spoerl, S., Chu, X., Bishop, D.K., Turka, L.A., and Li, X.C. (2012). New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo. *J Immunol* 188, 892-901.

Xiao, Y., Li, B., Zhou, Z., Hancock, W.W., Zhang, H., and Greene, M.I. (2010). Histone acetyltransferase mediated regulation of FOXP3 acetylation and Treg function. *Current opinion in immunology* 22, 583-591.

Xu, L., Kitani, A., Stuelten, C., McGrady, G., Fuss, I., and Strober, W. (2010). Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I. *Immunity* 33, 313-325.

Yamaguchi, T., Hirota, K., Nagahama, K., Ohkawa, K., Takahashi, T., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2007). Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity* 27, 145-159.

Yamaguchi, T., Wing, J.B., and Sakaguchi, S. (2011). Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Seminars in immunology* 23, 424-430.

Yang, J., Chai, L., Liu, F., Fink, L.M., Lin, P., Silberstein, L.E., Amin, H.M., Ward, D.C., and Ma, Y. (2007). Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10494-10499.

Yang, J.Q., Kim, P.J., and Singh, R.R. (2012). Brief treatment with iNKT cell ligand alpha-galactosylceramide confers a long-term protection against lupus. *Journal of clinical immunology* 32, 106-113.

- Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., *et al.* (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29, 44-56.
- Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W.T., Laurence, A., Robinson, G.W., Shevach, E.M., Moriggl, R., *et al.* (2007). Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 109, 4368-4375.
- Young, D.A., Lowe, L.D., Booth, S.S., Whitters, M.J., Nicholson, L., Kuchroo, V.K., and Collins, M. (2000). IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 164, 3563-3572.
- Yu, Q., Erman, B., Bhandoola, A., Sharrow, S.O., and Singer, A. (2003). In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 197, 475-487.
- Zanin-Zhorov, A., Ding, Y., Kumari, S., Attur, M., Hippen, K.L., Brown, M., Blazar, B.R., Abramson, S.B., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2010). Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science* 328, 372-376.
- Zanin-Zhorov, A., Lin, J., Scher, J., Kumari, S., Blair, D., Hippen, K.L., Blazar, B.R., Abramson, S.B., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2012). Scaffold protein Disc large homolog 1 is required for T-cell receptor-induced activation of regulatory T-cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1625-1630.
- Zenclussen, A.C., Gerlof, K., Zenclussen, M.L., Ritschel, S., Zambon Bertoja, A., Fest, S., Hontsu, S., Ueha, S., Matsushima, K., Leber, J., and Volk, H.D. (2006). Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *European journal of immunology* 36, 82-94.
- Zhan, Y., Zhang, Y., Gray, D., Carrington, E.M., Bouillet, P., Ko, H.J., O'Reilly, L., Wicks, I.P., Strasser, A., and Lew, A.M. (2011). Defects in the Bcl-2-regulated apoptotic pathway lead to preferential increase of CD25 low Foxp3⁺ anergic CD4⁺ T cells. *J Immunol* 187, 1566-1577.
- Zhang, R., Huynh, A., Whitcher, G., Chang, J., Maltzman, J.S., and Turka, L.A. (2013). An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *The Journal of clinical investigation* 123, 580-593.
- Zhang, X.L., Peng, J., Sun, J.Z., Liu, J.J., Guo, C.S., Wang, Z.G., Yu, Y., Shi, Y., Qin, P., Li, S.G., *et al.* (2009). De novo induction of platelet-specific CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from CD4(+)CD25(-) cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 113, 2568-2577.
- Zhang, Z.X., Yang, L., Young, K.J., DuTemple, B., and Zhang, L. (2000). Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nature medicine* 6, 782-789.
- Zhao, D.M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J., and Shevach, E.M. (2006). Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107, 3925-3932.
- Zheng, G., Wang, B., and Chen, A. (2004a). The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 173, 2428-2434.

- Zheng, L., Sharma, R., Gaskin, F., Fu, S.M., and Ju, S.T. (2007a). A novel role of IL-2 in organ-specific autoimmune inflammation beyond regulatory T cell checkpoint: both IL-2 knockout and Fas mutation prolong lifespan of Scurfy mice but by different mechanisms. *J Immunol* 179, 8035-8041.
- Zheng, S.G., Wang, J.H., Gray, J.D., Soucier, H., and Horwitz, D.A. (2004b). Natural and induced CD4⁺CD25⁺ cells educate CD4⁺CD25⁻ cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 172, 5213-5221.
- Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458, 351-356.
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808-812.
- Zheng, Y., Josefowicz, S.Z., Kas, A., Chu, T.T., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2007b). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936-940.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Jeker, L.T., Penaranda, C., Martinez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., and Bluestone, J.A. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature immunology* 10, 1000-1007.
- Zhu, J., Davidson, T.S., Wei, G., Jankovic, D., Cui, K., Schones, D.E., Guo, L., Zhao, K., Shevach, E.M., and Paul, W.E. (2009). Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF-beta is important for differentiation of Th17 and CD103⁺ inducible regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 206, 329-341.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology* 28, 445-489.
- Zhu, M.L., Nagavalli, A., and Su, M.A. (2013). Aire deficiency promotes TRP-1-specific immune rejection of melanoma. *Cancer research* 73, 2104-2116.
- Zimring, J.C., Lavery, S.B., Kniep, B., Kapp, L.M., Fuller, M., and Kapp, J.A. (2003). CD75s is a marker of murine CD8(+) suppressor T cells. *International immunology* 15, 1389-1399.